

5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

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

5

SEPTEMBER—OCTOBER

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.

5

СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ

**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 28.10.2023.
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 Vopengamage, 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.

5

SEPTEMBER–OCTOBER

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 October 28, 2023.

Print format 60×90^{1/8}.

Circulation 158 copies.

Printed at the Ob'yedinenny 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. Svitch, 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

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

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

- Надтока М.И., Лысенков В.Г., Аглетдинов М.Р., Мишкин А.А., Афонина Н.М., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.**
Изучение генетического разнообразия вируса ветряной оспы в отдельных регионах Российской Федерации при помощи высокопроизводительного секвенирования*267
- Калинин Е.В., Чаленко Я.М., Сафарова П.В., Фёдорова В.А., Ермолаева С.А.**
Анализ уровня продукции факторов инвазии InlA и InlB у изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных на территории Российской Федерации*276
- Павлова А.С., Кулешов К.В., Крутова Н.Е., Гусева А.Н., Подколзин А.Т.**
Характеристика антибиотикорезистентности нетифоидных сальмонелл, циркулирующих на территории Российской Федерации в период с 2019 по 2022 год*287
- Федорова Л.С., Ильякова А.В.**
Сравнительная оценка эффективности воздействия дезинфицирующих веществ на микроорганизмы в биоплёнке*302
- Игнатъев Г.М., Оксанич А.С., Казакова Е.В., Самарцева Т.Г., Отрашевская Е.В., Уйба С.В., Трухин В.П.**
Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке*310
- Тараканова Ю.Н., Борисова О.В., Дмитриев Д.А., Личутина М.В., Массино Ю.С., Печелюлько А.А., Сегал О.Л., Яковлева Д.А., Дмитриев А.Д.**
Сравнительный анализ уровня IgG в сыворотках крови больных COVID-19, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», и здоровых доноров до пандемии319
- Ветрова Е.Н., Чернышова А.И., Притчина Т.Н., Исаева Е.И., Морозова О.В.**
Мониторинг респираторных вирусных инфекций в 2011–2022 годах в Москве*328
- Вязовая А.А., Елисейев П.И., Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Никишова Е.И., Нарская О.В., Мокроусов И.В., Марьяндышеев А.О.**
Молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции возбудителя туберкулёза в Архангельской области338
- Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Кутырев В.В.**
Анализ изменения генома геновариантов *Vibrio cholerae* O1 El Tor в современный период пандемии холеры346
- Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троценко О.Е.**
Анализ циркуляции коксакивируса А6 в субъектах Дальневосточного федерального округа Российской Федерации в 2014–2019 годах358
- Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Попкова М.И., Соболева Е.А., Кулова Е.А., Уткин О.В.**
Филодинамическая характеристика гена *LMP-1* вируса Эпштейна–Барр, изолированного на территории Нижегородской области369

ОБЗОРЫ

- Михайлович В.М., Гейдаров Р.Н., Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В.**
Молекулярно-генетический портрет вирулентности *Stenotrophomonas maltophilia**380

НЕКРОЛОГ

- Памяти Беседновой Наталии Николаевны (02.02.1935–23.09.2023)391

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Nadtoka M.I., Lysenkov V.G., Agletdinov M.R., Mishkin A.A., Afonina N.M., Ploskireva A.A., Mikheeva I.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G. Studying the genetic diversity of the varicella-zoster virus in selected regions of the Russian Federation using high-throughput sequencing*	267
Kalinin E.V., Chalenko Ya.M., Safarova P.V., Fedorova V.A., Ermolaeva S.A. Analysis of production levels of InIA and InIB invasion factors in <i>Listeria monocytogenes</i> isolates collected in the Russian Federation*	276
Pavlova A.S., Kuleshov K.V., Krutova N.E., Guseva A.N., Podkolzin A.T. Characteristics of antibiotic resistance of non-typhoidal <i>Salmonella</i> circulating in the Russian Federation in the period from 2019 to 2022*	287
Fedorova L.S., Ilyakova A.V. Comparative evaluation of disinfectant efficacy against biofilm-residing microorganisms*	302
Ignatyev G.M., Oksanich A.S., Kazakova E.V., Samartseva T.G., Atrasheuskaya A.V., Uyba S.V., Trukhin V.P. Isolation and genetic analysis of the chikungunya virus from <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> mosquitoes captured in Central America*	310
Tarakanova Y.N., Borisova O.V., Dmitriev D.A., Lichutina M.V., Massino Y.S., Pechelyulko A.A., Segal O.L., Yakovleva D.A., Dmitriev A.D. Comparative analysis of IgG levels in blood sera from patients with COVID-19, persons vaccinated by «Gam-COVID-Vac» and healthy donors before the pandemic.....	319
Vetrova E.N., Chernyshova A.I., Pritchina T.N., Isaeva E.I., Morozova O.V. Monitoring of respiratory viral infections in Moscow during 2011–2022*	328
Vyazovaya A.A., Eliseev P.I., Gerasimova A.A., Solovieva N.S., Nikishova E.I., Narvskaya O.V., Mokrousov I.V., Mariandyshev A.O. Molecular epidemiological monitoring of the tuberculosis pathogen in the Arkhangelsk region.....	338
Smirnova N.I., Rybalchenko D.A., Lozovsky Yu.V., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Analysis of changes in the genome of <i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor genovariants during the current period of the cholera pandemic	346
Butakova L.V., Sapega E.Yu., Trotsenko O.E. Analysis of coxsackievirus A6 circulation in the territories of the Far Eastern Federal district of the Russian Federation in 2014–2019.....	358
Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Popkova M.I., Soboleva E.A., Kulova E.A., Utkin O.V. Phylogenetic characteristics of the <i>LMP-1</i> gene of the Epstein–Barr virus isolated in the Nizhny Novgorod region	369
REVIEWS	
Mikhailovich V.M., Heydarov R.N., Bocharova J.A., Chebotar I.V. Molecular-genetic portrait of virulence of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> *	380
OBITUARIES	
In memory of Natalia Nikolaevna Besednova (02.02.1935–23.09.2023)	391

ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-423>



Studying the genetic diversity of the varicella-zoster virus in selected regions of the Russian Federation using high-throughput sequencing

Maksim I. Nadtoka[✉], Vladislav G. Lysenkov, Matvei R. Agletdinov,
Andrey A. Mishkin, Natalia M. Afonina, Antonina A. Ploskireva,
Irina V. Mikheeva, Kamil F. Khafizov, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Varicella-zoster virus (VZV), the causative agent of the disease of the same name and herpes zoster, is phylogenetically divided into 8 clades, the distribution of which is characterized by geographic reference to certain regions of the world. For most countries, VZV clades circulating in their territories have been identified, however, such information is almost unavailable for Russia.

The **purpose** of the study is to develop an effective method for VZV typing using high-throughput sequencing technologies to identify the prevalence of various VZV clades in Moscow, Moscow Region, and Stavropol Territory.

Materials and methods. To genotype VZV, it is enough to refer to 7 nucleotide positions. Their unique combinations can be used to assign the virus to one of the clades. Short sections of nucleotide sequences of open reading frames were obtained using a developed set of primers.

Results. A VZV genotyping technique has been developed and optimized. Using this technique, primary data on the distribution of VZV clades in the studied regions have been obtained. Thus, it has been established that in Moscow and a number of other regions, the 1st, 3rd, and 5th clades of VZV are predominantly distributed.

Conclusion. The developed technique, including a primer panel and a genotyping algorithm, allows VZV typing in a short time while reducing specimen preparation costs and simultaneously increasing the number of specimens in one sequencing cycle. The results obtained using this assay allow us to assume that in Moscow, Moscow Region, Stavropol Territory, VZV, clades 1, 3, and 5 are the most represented ones. To confirm this hypothesis, it is necessary to include a larger number of clinical specimens in subsequent studies, including from other regions of the country.

Keywords: *varicella zoster virus, VZV, genotyping of varicella zoster virus, VZV genotyping, next generation sequencing, high-throughput sequencing*

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 Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 124, May 24, 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: Nadtoka M.I., Lysenkov V.G., Agletdinov M.R., Mishkin A.A., Afonina N.M., Ploskireva A.A., Mikheeva I.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G. Studying the genetic diversity of the varicella-zoster virus in selected regions of the Russian Federation using high-throughput sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2023;100(5):267–275.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-423>

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

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-423>

Изучение генетического разнообразия вируса ветряной оспы в отдельных регионах Российской Федерации при помощи высокопроизводительного секвенирования

Надтока М.И.[✉], Лысенков В.Г., Аглетдинов М.Р., Мишкин А.А., Афолина Н.М., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Вирус ветряной оспы (VZV) — возбудитель одноимённого заболевания и опоясывающего лишая, филогенетически подразделяется на 8 клад, для распространения которых характерна географическая привязка к тем или иным регионам мира. Для большинства стран установлены циркулирующие на их территориях клады VZV, однако для России аналогичная информация практически отсутствует.

Цель исследования — разработка эффективной методики типирования VZV с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования для выявления распространённости различных клад VZV в Москве, Московской области и Ставропольском крае.

Материалы и методы. Для генотипирования VZV достаточно задействовать 7 нуклеотидных позиций, по уникальным сочетаниям которых возможно отнести вирус к одной из клад. Короткие участки нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания получали при помощи разработанного набора праймеров.

Результаты. Разработана и оптимизирована методика генотипирования VZV. При помощи данной методики получены первичные данные о распределении клад VZV в исследуемых регионах. Таким образом, было установлено, что в Москве и ряде других регионов распространены преимущественно 1, 3 и 5-я клады VZV.

Заключение. Разработанная методика, включающая праймерную панель и алгоритм генотипирования, позволяет произвести типирование VZV в короткие сроки при снижении затрат на пробоподготовку и одновременном увеличении количества образцов в одном цикле секвенирования. Результаты, полученные с использованием данного протокола, позволяют сделать предположение о том, что в Москве, Московской области и Ставропольском крае наибольшую представленность имеют клады 1, 3 и 5 VZV. Для подтверждения данной гипотезы требуется включить в последующие исследования большее количество клинических образцов, в том числе из других регионов страны.

Ключевые слова: вирус ветряной оспы, VZV, генотипирование вируса ветряной оспы, генотипирование VZV, секвенирование следующего поколения, высокопроизводительное секвенирование

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 124 от 24.05.2022).

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: Надтока М.И., Лысенков В.Г., Аглетдинов М.Р., Мишкин А.А., Афолина Н.М., Плоскирева А.А., Михеева И.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г. Изучение генетического разнообразия вируса ветряной оспы в отдельных регионах Российской Федерации при помощи высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):267–275.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-423>

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

Introduction

Varicella-zoster virus (VZV) is a member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily, genus *Varicellovirus*, of the family *Herpesviridae*. The characteristic properties of this subfamily representatives are a short reproductive cycle, rapid propagation, and effective destruction of infected cells. VZV is able to replicate in a limited range of host organisms, which includes only cells of human and simian origin. The annual incidence of varicella zoster (VZ) ranges from 13 to 16 cases per 1,000 people, with significant year-by-year variations. In countries with temperate climates, the incidence of VZ, depending on age, is the highest among children of preschool (1–4 years) or primary school age (5–9 years) and amounts to more than 100 cases per 1,000 children a year. Thus, more than 90% of people become infected before adolescence, and only a small proportion of adults (<5–10%) remain susceptible to the disease. In the tropical climate, the exposure to infection occurs on average at an older age, with a higher proportion of infected cases among adults [1, 2].

VZV infection has a pronounced seasonal nature, with peak incidence occurring in winter and spring, with outbreaks occurring every 2–3 years. In developed countries, 5 out of 1,000 patients with VZ are hospitalized, and 2–3 cases of the disease per 100,000 infected people are fatal [2]. In the pre-vaccination era, VZ was a ubiquitous childhood infection in temperate countries. For example, in the United States, about 98% of the population was seropositive for VZV by the age of 20 years.

The first live attenuated vaccine (vOka) against this pathogen was obtained in 1974 through a series of passages of a wild-type clinical isolate of VZV (Oka). Later, this vaccine was improved, resulting in the release of Varivax (Merck Sharp & Dohme Corp.) [3]. The live attenuated vaccine consists of a mixture of different VZV genetic variants containing 42 single nucleotide polymorphisms that distinguish vOka from the parental wild-type Oka strain [2]. Due to the developed vaccine and the introduction of mandatory vaccination programs against VZV in different countries, hospitalization and mortality caused by VZ among children decreased by more than 90% [2, 3].

Varicella-zoster virus genome

Like all herpesviruses, VZV is a double-stranded DNA virus and has a 125,000-bp genome containing 72 open reading frames (ORFs) comprising 71 genes. Since the 3 genes are copies of other genes, the genome contains 68 unique genes. The viral genome consists of two main coding regions: unique long (U_L) and unique short (U_S) ones. The U_L region is flanked by short (≈ 88 bp) inverted repeats TR_L and IR_L , whereas the U_S region is flanked by long (7319 bp) TR_S and IR_S repeats. Five regions of the genome contain tandem direct repeats (R1, R2, R3, R4, and R5), which are short se-

quences with high G + C content [4, 5]. Three of these repeated sequences (R1, R2, and R3) are located in the coding region of the *ORF11*, *ORF14*, and *ORF22* genes, respectively, and thus may influence protein functions. Two copies of R4 are located within the IR and TR repeats adjacent to the replication origin point (OriS), and R5 is located between ORF60 and ORF61 [5].

VZV genotyping

Until 2008, there was no uniform nomenclature for VZV typing. Early classification of VZV was based on the results of restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay. The RFLP markers involved in these studies included the ORF38 (PstI), ORF54 (BglI), and ORF62 (SmaI) polymorphisms [6, 7]. Thus, most wild-type strains from the United States and Europe were characterized as PstI⁺BglI⁻; strains distributed in Asia and Africa – as BglI⁺; Oka-like wild-type strains from Japan – as PstI⁺/PstI⁻BglI⁺SmaI⁻; vaccine strains Oka – as PstI⁻BglI⁺SmaI⁺ [7, 8].

Attempts were made to identify VZV variants using complete genome screening for single nucleotide substitutions by heteroduplex mobility. This approach was used to evaluate substitutions in ORF1, ORF21, ORF50, and ORF54, which allowed identifying 4 major clades (genetic variants), named A, B, C, and J. Strains from Africa and Asia clustered in clade A, whereas clades B and C were predominantly composed of European strains. Subsequently, clade J was added to this genotyping scheme to account for Japanese strains [9, 10].

Another approach to genotyping is based on the single nucleotide polymorphisms assay in the gene sequences of 5 glycoproteins (gH, gI, gL, gB, gE), as well as the main transactivator gene IE62. It allowed classifying VZV strains into 4 clades: A, B, C, and D. Clades A and D were represented by isolates selected in North America and Europe, clades B and C consisted of VZV representatives common in Singapore and Japan, respectively [11, 12]. It should be noted that although the nomenclature of the clades from this study is much similar to the nomenclature used in the studies by W. Barrett-Muir et al. [8, 9], it has no correlation between the considered typing methods.

More recent phylogenetic analyses including both complete VZV genomes and their fragments have allowed the attribution of genomic variations to specific genetic variants and putatively recombinant viruses. Applying multilocus analysis of polymorphisms in the genomic sequences of VZV, 3 main genetic variants (clades) were identified: E (European), J (Japanese), and M (mosaic) [13]. Subsequently, the M genetic variant was divided into 4 separate variants: M1, M2, M3, and M4 [13, 14]. Strains belonging to genetic variants M1 and M2 were most common in tropical regions, genetic variant E – in temperate latitudes, and genetic variant J – in Japan. In some studies, a strain with the

M3 genetic variant was found in the USA, and strains with the M4 genetic variant were found in Spain and France [14, 15].

Since the nomenclature of VZV clades/genetic variants was based on various molecular typing methods, a new universal nomenclature was introduced in 2008, dividing the genetic variants into 5 major clades (1–5) with 2 conditional (candidate) clades (VI and VII) [16]. Also, now, in order to isolate VZV into a separate clade, the latter is required to include at least 2 representatives for which complete genome sequences have been obtained. Otherwise, such a clade is considered a candidate and is designated by Roman numerals.

By sequencing whole genomes from clinical VZV specimens collected in Germany, strains belonging to clades 1, 3, and 5, as well as strains that did not belong to any known clade, were discovered. Therefore, these representatives (1483/2005 and 457/2008) were allocated to separate candidate clades – VIII and IX, respectively [17]. Later, during the investigation of recombination events between the representatives of different VZV clades, a strain was found that grouped together with the only representative of clade VI in the phylogenetic tree. Thus, in 2015, candidate clade VI was converted to major clade 6 [18]. In 2017, the previously used VZV genotyping scheme was improved, which allowed identifying new representatives of candidate clade IX (one complete and one partial genome). However, only one isolate belonging to this clade (JN704710) was previously identified and described. The availability of the complete genome sequence of isolate KY037798 identified in this study met the requirement for conversion of candidate clade IX to major clade 9 [19].

As of today, VZV diversity is represented by 8 clades: 7 major clades (1–6 and 9) and 1 candidate clade VIII; clade VII has become irrelevant due to the lack of new isolates. The major VZV clades tend to be geographically confined to specific regions. In particular, clades 1, 3, and 6 are mainly spread in Europe, North America, and Australia, clade 2 – mainly in Asia. Clades 4 and 5 tend to be spread in multiple regions around the world; clade 5 is the only one reported to circulate in Africa [20]. Despite the vast amount of information on VZV clades circulating around the world, the distribution of VZV clades in Russia is not sufficiently clarified. There is virtually no relevant information on this subject in the scientific literature. In China's northern Xinjiang region, which borders with Russia, clades 1 and 3 are reported to be dominant [21].

As the first step towards obtaining reliable data on representatives of various VZV clades circulating in Russia, we have developed a specific primer panel that allows VZV typing in accordance with the scheme proposed by N.J. Jensen et al. [19]. The panel includes 6 pairs of primers covering short (about 200 bp) regions of open reading frames: ORF21, ORF22, ORF

29, ORF38, ORF55, ORF67, which contain 7 single nucleotide substitutions, the unique compositions of which make it possible to determine whether the virus belongs to one of the known clades. Thanks to the modification of primers by fusing them with Nextera adapter sequences along with the ability to sequence the resulting DNA libraries on the Illumina platform with reagent kits for short reads, it is possible to obtain typing results within 48 hours. Thus, the developed primer panel allows reducing financial and time costs while simultaneously increasing the number of specimens in one run of the device for high-throughput sequencing.

The solution that we developed, designed for rapid screening of a large number of clinical specimens, was tested on specimens from Moscow, Moscow Region, and Stavropol Territory, which made it possible to consider the representation of VZV in individual regions of the Russian Federation as a first approximation.

Materials and Methods

VZV specimens

The study used 75 VZV specimens collected from June 2022 to July 2023. Clinical specimens of viruses were obtained from patients mainly from Moscow (61 specimens), as well as from the Moscow Region (9 specimens) and Stavropol Territory (5 specimens). Biological material was collected after obtaining the voluntary consent of patients or their representatives. The study was approved at a meeting of the Local Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor on May 24, 2022 (Minutes No. 124).

Isolation of DNA and obtaining fragments of VZV genomes

The viral DNA was extracted from clinical specimens using a Ribo-PREP reagent kit (AmpliSens). The resulting DNA was then used as a template for PCR in order to amplify fragments of the VZV genome. Regions of open reading frames (ORF21, ORF22, ORF29, ORF38, ORF55, ORF67) containing discriminating mutations, according to which it is possible to perform VZV typing, were obtained using a developed set of primers (**Table 1**) mixed into a pool (**Table 2**).

Amplification was carried out in 25 µl of reaction mixture with the following composition: 10 µl PCR-mix-2 blue (AmpliSens), 1.8 µl of 4.4 mM deoxynucleoside triphosphate (AmpliSens), 1 µl of primer mixture, 5 µl of DNA template; the reaction mixture was brought to the required volume with H₂O mQ. For amplification, the following time and temperature protocol was applied: 95°C for 2 min; then 40 cycles: 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min; final elongation: 72°C for 3 min. The target fragments of VZV genomes were identified by ethidium bromide fluorescence in

1.7% agarose gel. The results of electrophoretic analysis were visualized using GelDoc EZ (Bio-Rad).

Preparation of libraries for sequencing

The PCR product was purified from the reaction mixture using AMPureXP beads (Beckman Coulter) in a ratio of 1 : 0.8 (specimen : particles). The primers used to amplify VZV genome segments are modified by fusing them with Nextera adapters (Illumina), resulting in the amplicons being flanked by specific sequences that facilitate preparation of the libraries. Barcoding was performed using 10 µl of PCR-mix-2 blue (AmpliSens), 1 µl of EvaGreen (Biotium) as a fluorescent intercalating dye, 2 µl of each barcode (5 pmol) and 8 µl of purified PCR product. The following time and temperature protocol was used for barcod-

ing: 98°C for 30 s; 12 cycles: 98°C for 10 s, 65°C for 1 min 15 s. The DNA concentration after barcoding was measured on a Qubit 4.0 fluorimeter using the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). The finished libraries were pooled and purified using AMPureXP magnetic beads (Beckman Coulter). The lengths of the finished libraries were identified using a 2100 Bioanalyzer automated electrophoresis system (Agilent Technologies).

Sequencing of VZV libraries

Sequencing was carried out on the Illumina MiSeq platform using the MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles) and MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles). At the same time, less than 0.5% of the MiSeq run was allocated to one specimen.

Table 1. List of primers used to amplify VZV genome fragments

Primer	Primer sequence with Nextera adapter sequence (5'→3')
VZV_1_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgcggttttaacttcacaatgtaat
VZV_1_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGctcatctggacgaagcca
VZV_2.2_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGttaccacaagcagctcag
VZV_2.2_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGtcatcaaaccatgtaaccctc
VZV_3_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGaatatgttacggggaccttga
VZV_3_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcaaaccacccaataggttga
VZV_4_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgcatatataccgcaacaactg
VZV_4_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcctcgccataaagccactac
VZV_5_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGccaccacggtggactatg
VZV_5_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGgaggagaccgtacgcca
VZV_6_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGctttgatcttcaagggcgac
VZV_6_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcgctatagttgtcccgg

Note. Capital letters indicate Nextera adapter sequences fused to primers (indicated in lower case letters).

Table 2. Composition of the mixture of primers for VZV typing

Primer	Primer concentration in mix, pmol/µl	Concentration after 2-fold dilution, pmol/µL
VZV_1_fwd	10,7	5,35
VZV_1_rev	10,7	5,35
VZV_2.2_fwd	7,1	3,55
VZV_2.2_rev	7,1	3,55
VZV_3_fwd	10,7	5,35
VZV_3_rev	10,7	5,35
VZV_4_fwd	9,5	4,75
VZV_4_rev	9,5	4,75
VZV_5_fwd	7,1	3,55
VZV_5_rev	7,1	3,55
VZV_6_fwd	4,7	2,35
VZV_6_rev	4,7	2,35

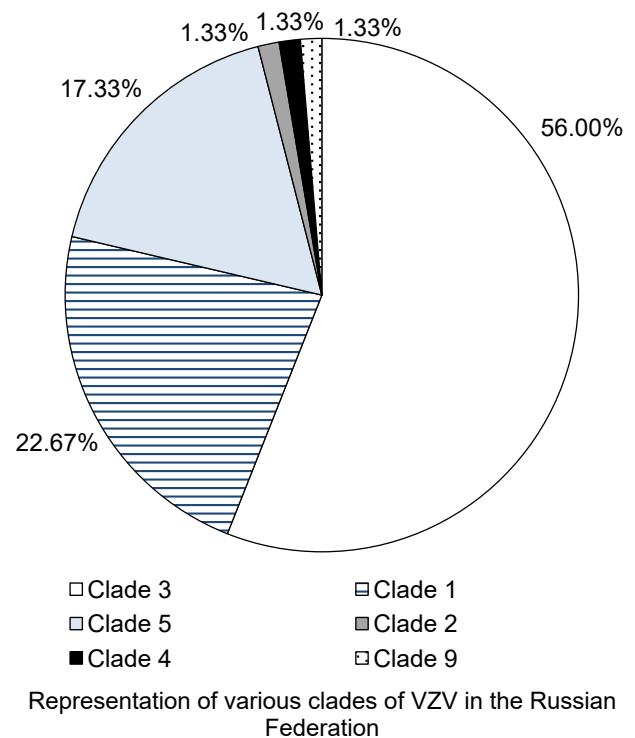
Determination of DNA sequences and genetic variants of specimens

After receiving “raw” data from the device, DNA reads were trimmed from the above-described primer sequences using the *fastp 0.23.0* software tool [22]. Next, using *bwa 0.7.17* [23], the reads were aligned (“mapped”) to the reference sequence of virus *NC_001348.1*, sorted and indexed using *samtools 1.15.1* [24]. The resulting alignments were presented as draft genome assemblies using *samtools 1.15.1* and an in-house script, and then remapped using *MAFFT v7.490* [25] to obtain final assemblies (consensus sequences).

According to the above-mentioned nomenclature of viral clades [19], successful genotyping needs only 7 positions, the combination of variations (single-nucleotide substitutions) in which indicates a particular clade (Table 3). The primers that we constructed (Table 1) are designed to include these variations.

Results

The primer panel that we developed, described in the previous section, covers short segments of 6 open reading frames: ORF21, ORF22, ORF29, ORF38, ORF55 and ORF67, which contain single-nucleotide substitutions that are targets for VZV typing. Using this panel, we sequenced clinical specimens of VZV obtained from patients from Moscow, Moscow Region, and Stavropol Territory. The resulting open reading frame segment sequences were sequenced on an Illumina MiSeq device with an average coverage of approximately 10^4 . The minimum coverage for each segment was approximately 300 reads. Consensus sequences were obtained by processing the raw sequencing data using previously described publicly available bioinformatics tools and an in-house script. The assembled consensus sequences were used as input to the de-



veloped algorithm that performs VZV genotyping based on discriminatory mutations. Using this genotyping algorithm, we found that 17 specimens (22.67% of the total number of analyzed sequences) belonged to clade 1, 42 specimens (56%) belonged to clade 3 (Figure), 13 (17.33%) specimens belonged to clade 5. In addition, among all sequenced specimens, we identified single cases of infections caused by VZVs of clade 2 (1.4%), 4 (1.4%), and 9 (1.4%) (Figure).

Discussion

In this study, we developed and optimized a technique for rapid typing of a large number of VZV

Table 3. The genotyping scheme proposed by N.J. Jensen *et al.* [19] (adapted)

Position in NC_001348.1	33725	37902	38055	52365	69424	98437	114639
ORF	21	22	22	29	38	55	67
Clade 1	T	A	T	C	G	T	T
Clade 2	C	G	C	C	G	C	T
Clade 3	C	A	T	C	A	T	T
Clade 4	C	A	C	T	G	C	T
Clade 5	C	A	T	T	G	T	T
Clade 6	C	A	T	C	A	C	C
Clade VIII	C	A	T	C	G	C	T
Clade 9	C	A	C	C	A	C	T

Note. The least common “discriminatory” variants are highlighted in black.

specimens. Moreover, using the described genotyping protocol, we obtained primary data on the VZV clades that have become widespread in Moscow, Moscow Region, and Stavropol Territory. Using next-generation sequencing technologies, we found that in the regions under consideration, viruses belonging to clades 1, 3, and 5 have become widespread. Also, we found single specimens belonging to clade 2, clade 4, and clade 9, which, compared to other clades, are a minor part of VZVs circulating in these regions of the Russian Federation. It is worth clarifying that the resulting picture of the distribution of clades is the most plausible for Moscow, since the largest number of clinical specimens were obtained from this region of the Russian Federation. In the future, if appropriate, it is planned to both increase the total number of specimens from the regions considered in this study and include other regions of Russia in the study.

At the moment, the data obtained as a result of our study only allow us to assume a largely similar picture of the distribution of VZV representatives in the studied regions of the Russian Federation and in European countries [20], and also correspond to the earlier reported data on circulating VZV clades in the region of China bordering Russia [21]. However, in the studied regions, apparently, a significantly larger proportion is occupied by viruses belonging to clade 3; in addition, the percentage of representation of clade 5 viruses in

these regions of the Russian Federation is also higher than in European countries.

Conclusion

VZV, the etiologic agent of varicella and herpes zoster, is divided into several clades characterized by distinct genetic properties. We have successfully used next-generation sequencing technique to genotype VZV, which includes a custom primer panel and genotyping algorithm, an approach that can speed up the data collection process and reduce specimen preparation costs, especially when increasing the number of specimens per sequencing run. Using this methodology, we found that VZV clades 1, 3, and 5 predominated in Moscow, Moscow Region, and Stavropol Territory. The identification of these VZV clades provides valuable epidemiological data useful for shaping public health strategies and lifts the veil off the prevalence of VZV clades in some regions of the Russian Federation.

Note that this study is a “pilot” one and is mostly methodological in nature. It is also worth mentioning that in this study we demonstrated the prevalence of VZV clades only for 3 of the many regions of the Russian Federation, thus, the issue of the global representation of various virus clades in our country remains open, and therefore future research should be continued and expanded in order to form a reliable picture of the distribution of VZV clades in Russia..

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Laing K.J., Ouwendijk W.J.D., Koelle D.M., Verjans G.M.G.M. Immunobiology of varicella-zoster virus infection. *J. Infect. Dis.* 2018;218(Suppl. 2):S68–74. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy403>
2. Gershon A.A., Breuer J., Cohen J.I., et al. Varicella zoster virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2015;1:15016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.16>
3. Schmid D.S., Jumaan A.O. Impact of varicella vaccine on varicella-zoster virus dynamics. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(1):202–17. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00031-09>
4. Schmidt-Chanasit J., Sauerbrei A. Evolution and world-wide distribution of varicella-zoster virus clades. *Infect. Genet. Evol.* 2011;11(1):1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.08.014>
5. Depledge D.P., Sadaoka T., Ouwendijk W.J.D. Molecular aspects of varicella-zoster virus latency. *Viruses.* 2018;10(7):349. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10070349>
6. LaRussa P., Lungu O., Hardy I., et al. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products from vaccine and wild-type varicella-zoster virus isolates. *J. Virol.* 1992;66(2):1016–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.1016-1020.1992>
7. Loparev V.N., Argaw T., Krause P.R., et al. Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38(9):3156–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.38.9.3156-3160.2000>
8. Quinlivan M., Hawrami K., Barrett-Muir W., et al. The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. *J. Infect. Dis.* 2002;186(7):888–94. DOI: <https://doi.org/10.1086/344228>
9. Barrett-Muir W., Scott F.T., Aaby P., et al. Genetic variation of varicella-zoster virus: evidence for geographical separation of strains. *J. Med. Virol.* 2003;70(Suppl. 1):S42–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.10319>
10. Muir W.B., Nichols R., Breuer J. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. *J. Virol.* 2002;76(4):1971–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.4.1971-1979.2002>
11. Faga B., Maury W., Bruckner D.A., Grose C. Identification and mapping of single nucleotide polymorphisms in the varicella-zoster virus genome. *Virology.* 2001;280(1):1–6. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0775>
12. Wagenaar T.R., Chow V.T., Buranathai C., et al. The out of Africa model of varicella-zoster virus evolution: single nucleotide polymorphisms and private alleles distinguish Asian clades from European/North American clades. *Vaccine.* 2003;21(11-12):1072–81. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00559-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00559-5)
13. Loparev V.N., Gonzalez A., Deleon-Carnes M., et al. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J. Virol.* 2004;78(15):8349–58. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.15.8349-8358.2004>
14. Loparev V., Martro E., Rubtcova E., et al. Toward universal varicella-zoster virus (VZV) genotyping: diversity of VZV strains from France and Spain. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(2):559–63. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01738-06>
15. Sergeev N., Rubtcova E., Chizikov V., et al. New mosaic subgenotype of varicella-zoster virus in the USA: VZV detection and genotyping by oligonucleotide-microarray. *J. Virol. Methods.* 2006;136(1-2):8–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.021>
16. Breuer J., Grose C., Norberg P., et al. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24–25 July 2008. *J. Gen. Virol.* 2010;91(Pt. 4):821–8. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.017814-0>
17. Zell R., Taudien S., Pfaff F., et al. Sequencing of 21 varicella-zoster virus genomes reveals two novel genotypes and evidence of recombination. *J. Virol.* 2012;86(3):1608–22. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.06233-11>
18. Norberg P., Depledge D.P., Kundu S., et al. Recombination of globally circulating varicella-zoster virus. *J. Virol.* 2015; 89(14):7133–46. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00437-15>
19. Jensen N.J., Rivaller P., Tseng H.F., et al. Revisiting the genotyping scheme for varicella-zoster viruses based on whole-genome comparisons. *J. Gen. Virol.* 2017;98(6):1434–8. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000772>
20. Pontremoli C., Forni D., Clerici M., et al. Possible European origin of circulating varicella zoster virus strains. *J. Infect. Dis.* 2020;221(8):1286–94. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz227>
21. Xu S., Chen M., Zheng H., et al. Nationwide distribution of varicella-zoster virus clades in China. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16(1):542. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1863-x>
22. Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34(17):i884–90. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
23. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14): 1754–60. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
24. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16): 2078–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
25. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic. Acids Res.* 2002;30(14):3059–66. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

Information about the authors

Maksim I. Nadtoka[✉] — junior researcher, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, maximnadtoka@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0002-3217-0963>

Vladislav G. Lyсенков — bioinformatician, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1468-1631>

Matvei R. Agletdinov — bioinformatician, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2249-7196>

Andrey A. Mishkin — junior researcher, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6911-6296>

Natalia M. Afonina — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory for immunological prophylaxis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3205-4025>

Antonina A. Ploskireva — D. Sci. (Med.), Deputy director for clinical work, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

Irina V. Mikheeva — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory for immunological prophylaxis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8736-4007>

Kamil F. Khafizov — PhD, Head, Genomics research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Author contribution. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, 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 26.07.2023;
accepted for publication 20.10.2023;
published 28.10.2023

Информация об авторах

Надтока Максим Игоревич[✉] — м.н.с. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, maximnadtoka@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0002-3217-0963>

Лысенков Владислав Геннадиевич — биоинформатик лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1468-1631>

Аглетдинов Матвей Рашидович — биоинформатик лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2249-7196>

Мишкин Андрей Альбертович — м.н.с. ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6911-6296>

Афонина Наталья Михайловна — к.м.н., н.с. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3205-4025>

Плоскирева Антонина Александровна — д.м.н., зам. директора ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по клинической работе, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

Михеева Ирина Викторовна — д.м.н., профессор, зав. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8736-4007>

Хафизов Камиль Фаридович — к.б.н., зав. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

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

Статья поступила в редакцию 26.07.2023;
принята к публикации 20.10.2023;
опубликована 28.10.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-397>

Analysis of production levels of InIA and InIB invasion factors in *Listeria monocytogenes* isolates collected in the Russian Federation

Egor V. Kalinin[✉], Yaroslava M. Chalenko, Polina V. Safarova, Victoria A. Fedorova, Svetlana A. Ermolaeva

Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Background. *Listeria monocytogenes* is characterized by the presence of epidemic hypervirulent clones. A key feature of *L. monocytogenes* is its capacity to invade non-professional phagocytic cells. Hypervirulent clones are strongly associated with the increased production and/or the presence of certain isoforms of invasion factors InIA and InIB.

The **purpose** of the study is to create a test system for InIA and InIB detection and to measure the InIA and InIB production levels in *L. monocytogenes* isolates belonging to clonal groups with different virulence potential.

Materials and methods. The study was performed using 32 *L. monocytogenes* strains belonging to epidemic clones ECII, ECIV, ECVII (clonal complexes CC1, CC2, CC7) and hypovirulent clonal complex CC9. Sequencing of *inIA* and *inIB* genes was performed. The indirect enzyme-linked immunosorbent assay was used to analyze the production levels of InIA and InIB proteins.

Results. The variability of InIA was revealed among strains belonging to the same clonal complex: 3 InIA isoforms were identified among strains belonging to CC7; out of 8 strains belonging to CC9, one strain had a stop codon in the *inIA* gene, leading to the loss of function of the InIA protein. The differences between *inIB* alleles correlated with the specificity of strains belonging to a certain clonal complex. Differences in production levels of invasion factors were measured. In strains belonging to CC9, the InIA production level was 2.5 times as low compared to strains belonging to CC1, CC2, and CC7. In strains belonging to phylogenetically related CC1 and CC2, the InIB production level was on average 4 times as high compared to strains belonging to CC7 and CC9.

Conclusion. The obtained results confirm the variability of major invasion factors both among clonal complexes and strains of the same complex. The increased production of invasion factors InIA and InIB correlates with the potential virulence of strains.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, InIA, InIB, enzyme-linked immunosorbent assay

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya Research Centre of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 54, July 24, 2023).

Funding source. This study was supported by the Russian Science Foundation (project number 21-74-00105).

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

For citation: Kalinin E.V., Chalenko Ya.M., Safarova P.V., Fedorova V.A., Ermolaeva S.A. Analysis of production levels of InIA and InIB invasion factors in *Listeria monocytogenes* isolates collected in the Russian Federation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):276–286.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-397>

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

Научная статья
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-397>

Анализ уровня продукции факторов инвазии InlA и InlB у изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных на территории Российской Федерации

Калинин Е.В.[✉], Чаленко Я.М., Сафарова П.В., Федорова В.А., Ермолаева С.А.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. *Listeria monocytogenes* характеризуется наличием эпидемически высоковирулентных клонов. Инвазия в непрофессиональные фагоциты — ключевой момент листериозной инфекции. Формирование высоковирулентных клонов обусловлено повышенной продукцией и/или наличием определённых изоформ факторов инвазии белков InlA и InlB.

Цель исследования — создать тест-систему для обнаружения InlA и InlB и на её основе оценить уровни продукции InlA и InlB у изолятов *L. monocytogenes*, относящихся к клональным группам с различным вирулентным потенциалом.

Материалы и методы. В работе использованы 32 штамма *L. monocytogenes*, относящихся к эпидемическим клонам ECII, ECIV, ECVII (клональные комплексы CC1, CC2, CC7) и гиповирулентному клональному комплексу CC9. Проведено секвенирование генов *inlA* и *inlB*. Для анализа уровня продукции белков InlA и InlB использован непрямой иммуноферментный анализ.

Результаты. Выявлена вариабельность InlA среди штаммов, относящихся к одному клональному комплексу: в том числе среди штаммов, принадлежащих к CC7, выявлены 3 изоформы InlA; из 8 штаммов, принадлежащих к CC9, у одного выявили стоп-кодон в гене *inlA*, приводящий к утрате функциональности белка InlA. Различия между аллелями *inlB* коррелировали с принадлежностью штаммов к конкретному клональному комплексу. Установлены различия в уровне продукции факторов инвазии. У штаммов, относящихся к CC9, уровень продукции InlA был в 2,5 раза ниже по сравнению со штаммами, относящимися к CC1, CC2 и CC7. Уровень продукции InlB был в среднем в 4 раза выше у штаммов, принадлежащих к филогенетически родственным CC1 и CC2, по сравнению со штаммами, относящимися к CC7 и CC9.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о вариабельности основных факторов инвазии как между клональными комплексами, так и между штаммами одного комплекса. Повышенная продукция факторов инвазии InlA и InlB коррелирует с потенциальной вирулентностью штаммов.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, InlA, InlB, иммуноферментный анализ

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 54 от 24.07.2023).

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФ № 21–74–00105.

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

Для цитирования: Калинин Е.В., Чаленко Я.М., Сафарова П.В., Федорова В.А., Ермолаева С.А. Анализ уровня продукции факторов инвазии InlA и InlB у изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных на территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):276–286.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-397>

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

Introduction

Listeria monocytogenes causes a dangerous foodborne infection with a high (around 30%) mortality rate in high-risk individuals as well as in domestic and wild animals [1, 2]. The genetic structure of the *L. monocytogenes* species is divided into 4 phylogenetic lineages [3].

Phylogenetic lineage I includes clonal complexes (CCs) CC1, CC2, CC4, and CC6 most frequently associated with listeriosis in humans [4]. Using different methods, CC1 and CC2 strains were assigned to epidemic clones ECII and ECIV, respectively, which were involved in large listeriosis outbreaks in different countries, including Russia. In Europe and the United States, the strains isolated from clinical cases are mostly represented by CC1 strains accounting for 11.4% [5].

Until 1980, in Russia, lineage II strains isolated from human and animal listeriosis cases as well as from natural sources prevailed; most of them belonged to CC7 (also known as epidemic clone ECVII) [6]. CC7 strains still prevail in natural foci in the European part of Russia; they are also frequently isolated from sporadic cases of listeriosis in humans and animals [7]. Lineage II CC9 strains are often isolated from food and environmental sources; they are also well represented in Russia [7]. In the infectious disease pathology classification in Europe and North America, CC7 strains are assigned to medium virulent strains, while clonal complex CC9 is considered low virulent [8]. The difference in the occurrence frequency among clinical isolates and, consequently, the difference in the potential virulence of strains belonging to different CCs and/or phylogenetic lineages are associated by multiple researchers with the presence of additional virulence factors [9], allelic variation of virulence factors [10], and their expression levels [11].

The initial stage of infection starts with the interaction between *Listeria* and non-professional phagocytes, involving proteins belonging to the internalin family — InlA and InlB, which promote the *L. monocytogenes* invasion of intestinal enterocytes and epithelial cells through an interaction with target receptors. E-cadherin is a specific receptor for InlA. InlB specifically interacts with two receptors: c-Met and gC1q-R [12]. The presence of functional InlA is sufficient for invasion into enterocytes [13]; the entry into hepatocytes requires InlB [14], and the coordinated action of InlA and InlB mediates the crossing of the placental barrier [15].

Sequencing is performed to identify allelic variation of *inlA* and *inlB* genes. The study results show that clinical strains and, most importantly, strains causing fetal and neonatal infections express full-length InlA more often than strains of food origin. Truncated InlA was detected in most of the hypovirulent CC9 and CC121 isolates [16] and in other clonal complexes of phylogenetic lineage II (for example, CC331, CC199, and CC321) [4].

Earlier it was found that clinical and food isolates differed in *inlA* and *inlB* gene expression levels [11]. The expression of key pathogenicity factors is activated during cell infection and depends on transcriptional regulator PrfA. *L. monocytogenes* has an extensive cross-talk system between σ^B and PrfA regulatory networks, providing optimal expression of genes required in extrahost environments, including repression of genes associated with virulence. Conversely, in intrahost environments, this regulatory network provides elevated expression of genes associated with virulence, enabling successful invasion [17]. The PrfA activity decreases when *L. monocytogenes* is grown in rich media. Hydrophobic adsorbents included in the culture medium activate PrfA and induce enhanced activity of virulence factor genes [18]. However, the mechanisms regulating production levels of the respective proteins-pathogenicity factors remain unknown.

Various techniques are used to detect and measure levels of protein expression, including enzyme activity assays and immunoblotting. Enzyme activity measurement cannot be used if proteins are not biocatalysts. Immunoblotting is a labor-intensive process unsuitable for testing large sample sizes. A test system based on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed as an alternative method for the qualitative and quantitative assessment of InlA and InlB. Using this ELISA test system, we assessed *L. monocytogenes* isolates from the collection of the Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology (Gamaleya RCEM) for InlA and InlB expression levels and their correlation with the phylogenetic status of the strains.

Materials and methods

Bacterial strains and bacteria culturing conditions

The study was performed using *Listeria* spp. strains from the collection of Gamaleya RCEM (Table 1). Microorganisms were grown in a BHI liquid medium (Becton Dickinson) at 37°C with constant shaking at 180 rpm. PrfA was activated by supplementing the BHI broth with 1% (w/v) Amberlite XAD 4 hydrophobic adsorbent (Sigma-Aldrich).

PCR analysis

The collection-derived *L. monocytogenes* isolates were lysed with lysozyme at a concentration of 20 µg/ml for 1 hour at 37°C; then, the lysates were treated with proteinase K at a concentration of 25 µg/ml at 56°C for 1 hour. The obtained samples were boiled in a water bath for 10 min. The amplification of *inlA* and *inlB* genes was performed in a Tertsik thermal cycler (DNA-Technology) using TransStart Taq DNA Polymerase (TransGen): stage 1 (1 cycle): 94°C — 4 min; stage 2 (30 cycles): 94°C — 30 sec, 52°C — 30 sec, 72°C — 2 min; stage 3 (1 cycle): 72°C — 10 min. Primers were selected using the Ugene v. 40.1

Table 1. *Listeria* spp. strains used in the study

Strain	Characteristics	Source	Reference
<i>L. monocytogenes</i>			
<i>EGDe</i>	CC9	Type strain	BIGSdb ID = 1
<i>EGDeΔinlB</i>	<i>inlB</i> deletion	Kindly provided by Prof. J. Vazquez-Boland	
<i>EGDeΔinlA</i>	<i>inlA</i> deletion		
<i>VIMHA004</i>	CC2	Newborn	BIGSdb ID = 3449
<i>VIMHA007</i>	CC2	Newborn	BIGSdb ID = 3450
<i>VIMHA006</i>	CC2	Newborn	BIGSdb ID = 3606
<i>VIMHA009</i>	CC1	Newborn	BIGSdb ID = 3452
<i>VIMHA011</i>	CC1	Newborn	BIGSdb ID = 3454
<i>VIMHA010</i>	CC1	Newborn	BIGSdb ID = 3453
<i>VIMHA012</i>	CC1	Newborn	BIGSdb ID = 3607
<i>VIMHA017</i>	CC1	Newborn	BIGSdb ID = 3609
<i>L.mo25</i>	CC1	Chicken	BIGSdb ID = 79358
<i>L.mo70</i>	CC8	Chicken	BIGSdb ID = 78808
<i>L.mo78</i>	CC37	Chicken	BIGSdb ID = 79363
<i>VIMPH006</i>	CC7	Carrier	BIGSdb ID = 3464
<i>L.mo71</i>	CC59	Chicken	BIGSdb ID = 78809
<i>GIMC2010:LmcUH8</i>	CC7	Carrier	BIGSdb ID = 42978
<i>GIMC2032:LmcINH-1</i>	CC7	Carrier	BIGSdb ID = 45728
<i>GIMC2007:LmcIH1_3</i>	CC7	Carrier	BIGSdb ID = 42975
766	CC7	Swine	BIGSdb ID = 5803
<i>VIMPR134</i>	CC7	Rodent	BIGSdb ID = 3459
<i>VIMPR422</i>	CC7	Rodent	BIGSdb ID = 3460
<i>VIMPA064</i>	CC7	Newborn	BIGSdb ID = 3455
<i>L.mo84</i>	CC37	Meat	BIGSdb ID = 79367
<i>L.mo49</i>	CC9	Chicken	BIGSdb ID = 79359
<i>L.mo129/3</i>	CC9	Dairy products	BIGSdb ID = 78797
<i>L.mo75</i>	CC9		BIGSdb ID = 79362
<i>GIMC2035:Lmc7218</i>	CC9	Fish	BIGSdb ID = 45731
<i>GIMC2017: Lmc921</i>	CC9	Meat	BIGSdb ID = 42987
<i>L.mo98-20</i>	CC9	Dairy products	BIGSdb ID = 78795
<i>LO28</i>	CC9	Type strain	BIGSdb ID = 3364
<i>L. ivanovii</i>			
ATCC 19119		Type strain	American Type Culture Collection

software and synthesized by the Syntol Company. For the *inlA* gene, the primers were as follows: InlA1 5'-ggttgaaaagtataactagtagc-3'; InlA2 5'-ggaagatattagcccaatttc-3', for the *InlB* gene: InlBF 5'-gcttatgatcctataattcaaaagaag, InlBR 5'-gaaaagctgcagaaaatc-cgccttc. Gel electrophoresis was used for detecting amplification products. Target DNA fragments were purified using a Dia-gene kit (Dia-M).

Sequencing

Samples were prepared for sequencing following the recommendations of the Genome Shared Resource Center. The DNA sequencing was performed using an ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 reagent kit; the reaction products were analyzed using an automated sequencer — Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. To identify gene sequences, the following primers

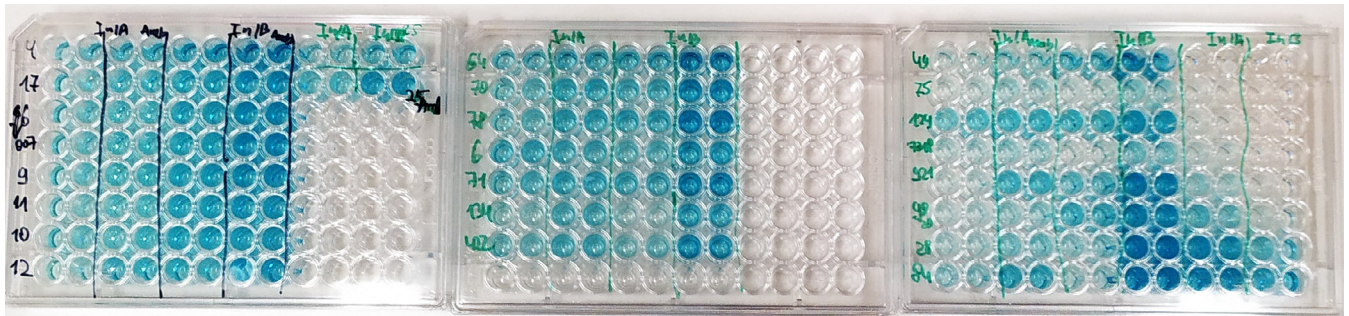


Fig. 1. 96-well plate and test results.

were used: InlA1 5'-ggttgaaaagtatactagtagc-3'; InlA2 5'-ggaagatattagcccaatttc-3'; InlA-R 5'-cttctttgaa-tataggatccataagc-3', InlA3 5'-ccaatatcccggaagc-tat-3', 5'-gcttatggatcctataattcaaaagaag-3', InlBR 5'-gaaaagctgcagaaaatccgccttc-3' InlB1 5'-gaagcag-gatcccgataactgcac-3', InlB2 5'-atagcgggtaagtgtgact-gc-3'. The nucleotide sequences were analyzed using the Ugene v. 40.1 software and the BigSdb-Pasteur database¹.

Production of polyclonal monospecific antibodies against InlA and InlB

Rabbits were immunized with purified recombinant InlA and InlB proteins, as previously described [19]. The work with laboratory animals was performed in compliance with ethical principles. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya Research Centre of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 54, July 24, 2023).

The globulin fraction of hyperimmune sera was precipitated by adding a saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (Ruskhim). The precipitate containing IgG was dissolved in 0.01 M Na-phosphate buffer (pH 6.5) and dialyzed against the same buffer. The obtained solution was passed through a DEAE Sephadex A-50 column and the IgG fraction was collected in the void volume. The affinity column was used to separate antibodies against the respective recombinant InlA and InlB proteins immobilized on an activated BrCN Sepharose (GE Healthcare). The fraction obtained from the DEAE chromatography was washed with 0.3 M NaCl and eluted with 4.5 M MgCl_2 (Ruskhim). The obtained samples were dialyzed against phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich), pooled, mixed with glycerol to a concentration of 50% and stored at -20°C .

Western blot analysis of L. monocytogenes lysates

Cell wall proteins were obtained from an overnight culture grown in a BHI broth supplemented with 1% Amberlite XAD-4. The lysates were separated by SDS-PAGE in a 10% gel under Laemmli denaturing conditions and transferred onto a 0.45 μm pore-size nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The nitrocellulose

membranes were incubated with obtained antibodies against InlA or InlB, respectively, at 1:10000 dilution for 1 hour. Then, the membranes were washed 3 times with TTBS buffer (Bio-Rad) and anti-rabbit IgG secondary antibodies (at 1:20000 dilution) were added. The target InlA and InlB proteins were visualized on the membrane using the TMB substrate (Thermo Fisher Scientific). GAPDH antibodies were used to control protein loading (at 1:1000 dilution (Thermo Fisher Scientific).

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay

Bacterial cells were grown in a BHI medium for 24 hours; then, they were centrifuged and washed three times with phosphate-buffered saline. The obtained samples reached an optical density of $\text{OD}_{600} = 0.2$. To verify that the number of cells has not changed, the cell cultures were seeded in an agar medium. The wells of a 96-well plate were coated with aliquots containing 100 μl of the respective tested *L. monocytogenes* strains. The plates were incubated at 37°C for 1 hour; then, they were washed three times with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) (Ruskhim); the unoccupied sites in the wells were blocked by adding 200 μl of 2% bovine serum albumin (Dia-M) diluted in phosphate-buffered saline for 30 min. Upon completion of the incubation, the blocking buffer was removed and 100 μl of anti-InlB or anti-InlA antibodies were added at 1:4000 dilution in TTBS and incubated for 1 hour at room temperature with continuous shaking at 140 rpm. Then, the wells were washed three times with TTBS and 100 μl of secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase, Bio-Rad), were added to TTBS. Then, the plates were washed 6 times with 250 μl of TTBS and developed by adding 100 μl of TMB substrate. To stop the reaction, 100 μl of 2 M H_2SO_4 (Ruskhim) was used. The optical density was measured at the wavelength of 450 nm using an iMark spectrophotometer (BioRad). The InlA and InlB concentration was measured using the calibration curve (Fig. 1).

Statistical analysis

All tests were repeated at least 3 times. The statistical analysis included one-way ANOVA and Tukey's test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically

¹ URL: <https://bigsdbs.pasteur.fr/listeria>

significant.

Results

Analysis of the occurrence frequency of isolates deposited in the BigSdb-Pasteur database depending on the phylogenetic status and the region of isolation

A total of 111 isolates collected in Russia from farm animals and humans infected with *L. monocytogenes* have been deposited in the BigSdb-Pasteur database. Out of them, 83 isolates were collected in 1958-2019 by researchers of the Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, the Federal Research Center of Virology and Microbiology, Gamaleya RCEM and the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, using clinical materials collected from stillborn infants with perinatal listeriosis, from pregnant women without clinical signs of infection, and from samples collected from patients with neuroinfectious and lung tissue lesions. The analysis of the database showed that human listeriosis cases were mostly caused by strains belonging to CC7 (phylogenetic lineage II), CC1, and CC2 (phylogenetic lineage I) accounting for 16, 11, and 8% of the isolates, respectively. Isolates belonging to CC9 (phylogenetic lineage II) accounted for 2% (**Fig. 2**).

Then, we analyzed the distribution with reference to CCs for isolates collected in Europe (excluding countries of the former Soviet Union) from clinical material of patients with listeriosis. A total of 747 isolates were deposited in the database. Note that 723 isolates represent

the same clonal complexes that are identified in Russia. However, the percentage of some CCs among clinical isolates collected in Europe differed from those in Russia. Most of the European isolates belonged to CC1, CC6, and CC2 (23, 15, and 14%, respectively).

Assessment of the *inlA* and *inlB* diversity among *L. monocytogenes* isolates originated from Russia, Gamaleya RCEM collection

The database analysis showed that among phylogenetic lineage II strains prevailing in Russia, strains belonging to CC7 are more common among clinical isolates compared to strains belonging to CC9. To gain an insight into mechanisms responsible for these differences, we sequenced *inlA* and *inlB* genes of 32 strains belonging to the above CCs identified in Russia.

Among the strains belonging to CC7, we identified 3 *inlA* allelic variants; 15 strains had allele 2 of the *inlA* gene, which was presented in the BigSdb-Pasteur database. However, in 2 strains, *inlA* differed from the alleles deposited in the above database. The detected mutations were nonsynonymous, thus suggesting that substitutions may be of functional significance. The VIMPA064 isolate contained 1 nonsynonymous substitution leading to the substitution of glutamine at position 364 for proline in the internalin domain involved in the protein-protein interaction with the E-cadherin eukaryotic receptor. VIMPH006 contained 3 nonsynonymous substitutions at positions 618, 620, and 621 (proline, lysine, and glutamine instead of alanine, glutamine, and serine) outside the internalin domain. None of the

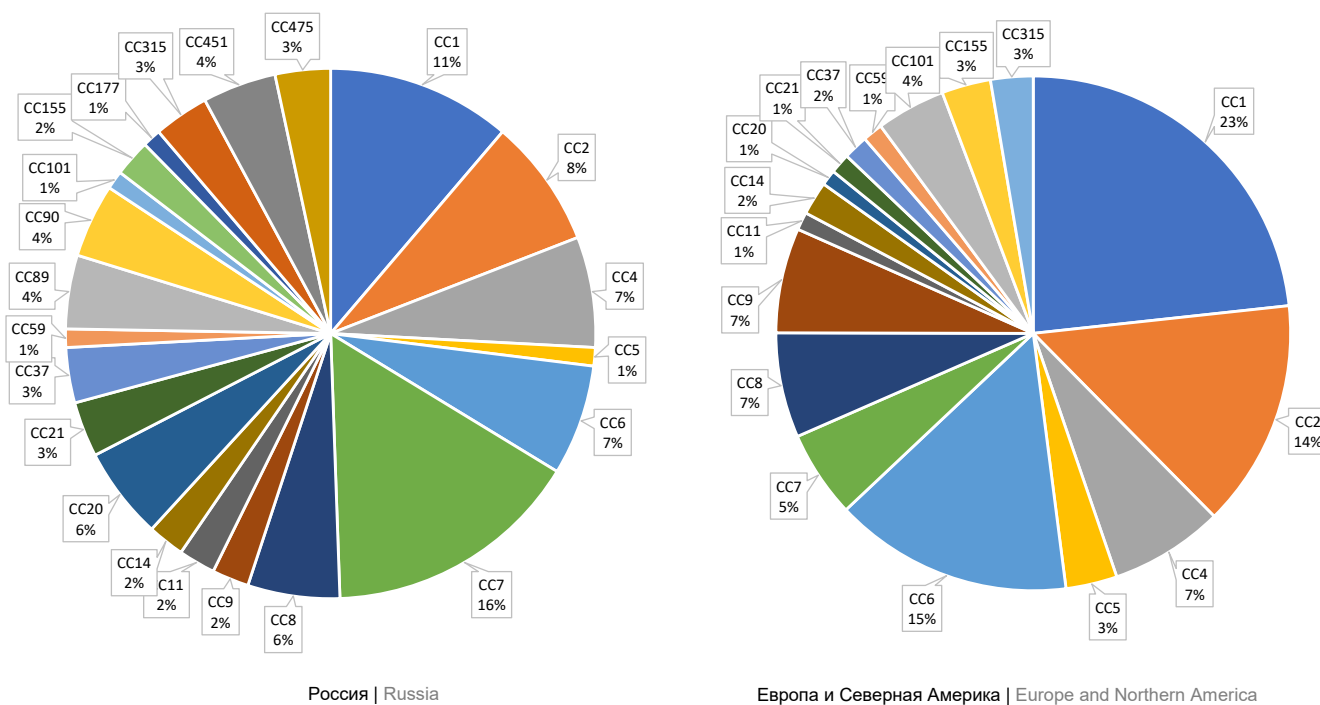


Fig. 2. CC occurrence frequency among *L. monocytogenes* strains from the ListiList database (Institut Pasteur, France), for Russia, countries of Europe and North America.

alleles of CC7 strains contained premature stop codons.

Among 9 strains belonging to CC9, 1 strain had a stop codon in the *inlA* gene. The stop codon was located outside the internalin domain; however, it prevented the synthesis of the full-length protein and, specifically, the binding of the protein to the bacterial surface, which is essential for the functional activity of InlA as an invasion factor. The other 8 CC9 strains encoded the full-length *inlA* allele 1 variant. The data on sequences of *inlA* genes are available in the GenBank database under accession numbers OQ865090–OQ865119.

The *inlB* gene sequencing in 32 strains did not reveal any specific features within the clonal complexes. Allele 2 was identified for strains belonging to CC7, and allele 1 was identified for CC9 strains.

Thus, the analysis of *inlA* and *inlB* sequences showed that strains belonging to CC7 and CC9 were characterized by intraclonal variability of *inlA*, while *inlB* was conserved for all strains belonging to a specific clone. The alleles identified among highly virulent CC7 strains encoded different InlA isoforms, thus suggesting that there may be differences in their interaction with the target receptor on the surface of human cells. The variant encoded by the alternative *inlA* allele, which was identified among CC9 strains rarely found among clinical isolates, encoded a nonfunctional truncated protein.

Expression levels of the *L. monocytogenes* InlB pathogenicity factor in strains CC1, CC2, CC7, and CC9

Two ELISA-based test systems were designed to assess the correlation between the production levels of invasion factors InlA and InlB and the occurrence frequency of strains belonging to the above CCs among clinical isolates. The protein concentration was measured using calibration curves from 5 to 1000 ng/ml. Recombinant InlA and InlB were used as reference

standards (**Fig. 3**).

The PrfA regulator controls the transcription of both genes encoding InlA and InlB proteins [12]. When *L. monocytogenes* are grown in nutrient media, the PrfA activity increases in the presence of hydrophobic adsorbents (activated carbon or Amberlite XAD4), reaching levels typically demonstrated by bacteria during infection [18]. To analyze changes in the invasion levels depending on the PrfA status, we measured InlA and InlB levels without activation and with activation of the PrfA regulon, depending on the presence of the Amberlite XAD4 adsorbent in the medium. Without PrfA activation, the InlA level in *L. monocytogenes* strains ranged from 5 to 65 ng/ml (**Fig. 4**). On average, the strains belonging to CC1, CC2, and CC7 demonstrated higher InlA levels compared to the strains belonging to CC9 (53.5 ± 5.3 ng/ml compared to 21.1 ± 3.2 ng/ml; $p < 0.05$). The L.mo129-3 strain belonging to CC9 was an exception, demonstrating the level comparable with CC1, CC2, CC7 strains (59.1 ± 1.5 ng/ml).

The medium supplemented with the Amberlite XAD4 adsorbent and the resulting activation of PrfA led to increased InlA concentration in all strains by 31% on average. In some strains the concentration reached the highest levels: VIMHA017 (CC1) — 99 ng/ml, VIMHA007 (CC2) — 93 ng/ml, L.mo71 — 107 ng/ml (CC7), L.mo129-3 (CC9) — 90 ng/ml.

Among the strains, InlB levels ranged from 15 to 958 ng/ml without activation of the PrfA regulon (**Fig. 5**). On average, the concentration in CC1 and CC2 strains was 740.5 ng/ml, being significantly higher than in CC7 and CC9 strains (209.5 and 177.9 ng/ml, respectively). However, compared to InlA, the InlB level in L.mo129-3 strain did not reach values typical of CC1 and CC2 strains and was twice as low ($p < 0.05$).

When PrfA was activated, the InlB concentration reached the highest levels of 1,353 ng/ml for CC1 and

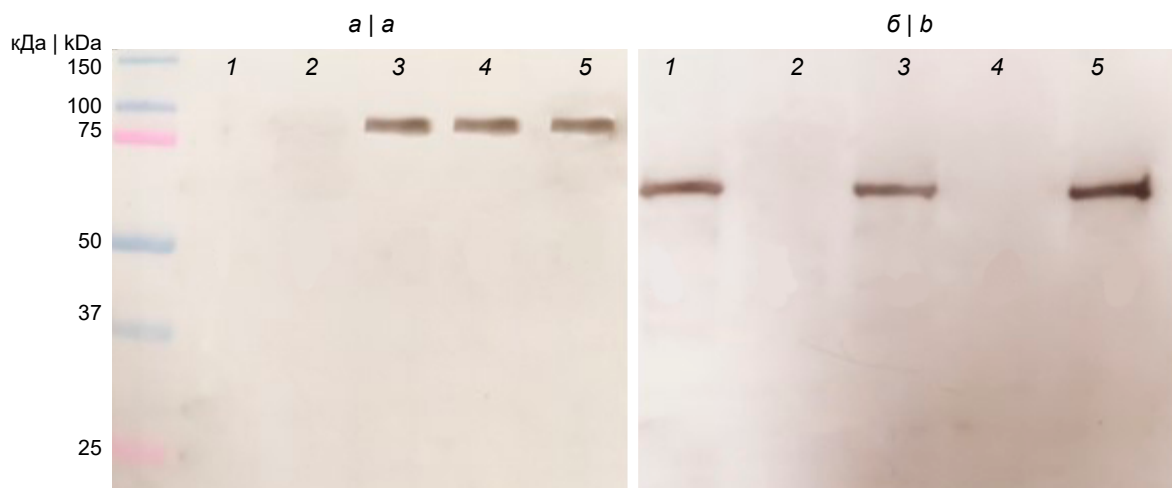


Fig. 3. Immunoblot of *Listeria* spp. cell lysates.

a — monospecific antibodies against InlA; *b* — monospecific antibodies against InlB. 1 — *L. monocytogenes* EGDe Δ *inlA*; 2 — *L. ivanovii* ATCC 19119; 3 — *L. monocytogenes* EGDe (CC9); 4 — *L. monocytogenes* EGDe Δ *inlB*; 5 — *L. monocytogenes* L.mo49 (CC9).

CC2 strains, 917 ng/ml — for CC7 strains, 835 ng/ml — for CC9 strains. The highest InIB levels were demonstrated by CC7 strains (a 3.29-fold increase compared to the levels without activation). In the strains belonging to CC9 and phylogenetic lineage I (CC1, CC2), the InIB levels increased 2.93 and 1.54 times, respectively, in the presence of the adsorbent.

Discussion

In *L. monocytogenes*, like in most of the other pathogenic bacteria, clonal groups and lineages differ in their virulence potential [20, 21]. For example, phylogenetic lineage II strains are frequently associated with food products, while phylogenetic lineage I strains are commonly found in clinical isolates. However, the distribution among sources is different even within phylogenetic lineages. For example, phylogenetic lineage II strains belonging to CC7 are more frequently isolated from clinical samples than strains belonging to CC9 [20]. The underlying causes of this heterogeneity must be identified to understand the mechanisms of evolution and development of highly virulent strains.

In some pathogenic bacteria such as enteropathogenic *Yersinia*, the differences in virulence are associated with the presence of additional pathogenicity factors, which can be located on plasmids and mobile genetic elements [22]. The search of additional pathogenicity

factors in *L. monocytogenes* strains belonging to clonal complex CC1 resulted in the discovery of LLS bacteriocin, which, presumably allows *Listeria* to survive longer in the presence of normal microbiota, though it is not a true pathogenicity factor and is absent in other highly virulent strains belonging to other CCs [23].

We have proposed an alternative hypothesis on the role of variability of major pathogenicity factors as the main mechanism responsible for development of highly virulent *L. monocytogenes* strains and other saprotoxic pathogens [24]. Natural InIB isoforms differ from each other both in the kinetics of activation of intracellular signaling pathways and in the binding constant to their target receptors c-Met and gC1qR [25, 26]. Strains that differed only in the InIB isoform differed in their ability to support gastrointestinal infection in mouse-like rodents, while InIB isoforms were responsible for different invasion of these strains into animal epithelial cells (sheep kidney cells, shKEC) [10]. In our study, we demonstrated the variability of another invasion factor — the InIA protein among strains belonging to phylogenetic lineage II CCs: CC7 and CC9. Among the analyzed strains, we identified one strain with a non-functional InIA protein, thus demonstrating a relatively insignificant role of CC9 in the clinical spread of listeriosis and being consistent with the findings of other researchers [27].

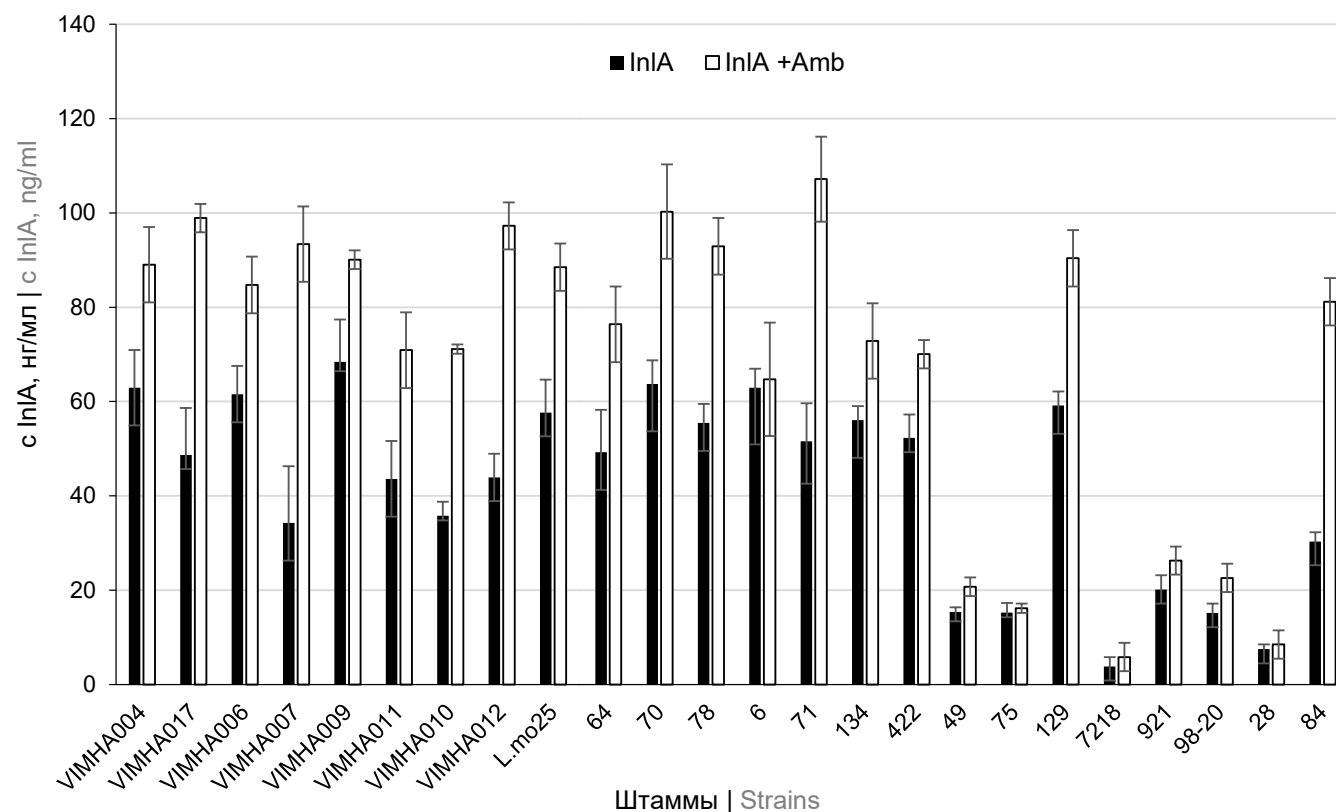


Fig. 4. Levels of InIA isolates belonging to different CCs.

The InIA concentration was measured using the new ELISA test system. Bacteria were grown in a BHI medium without and with the addition of 1% Amberlite XAD4.

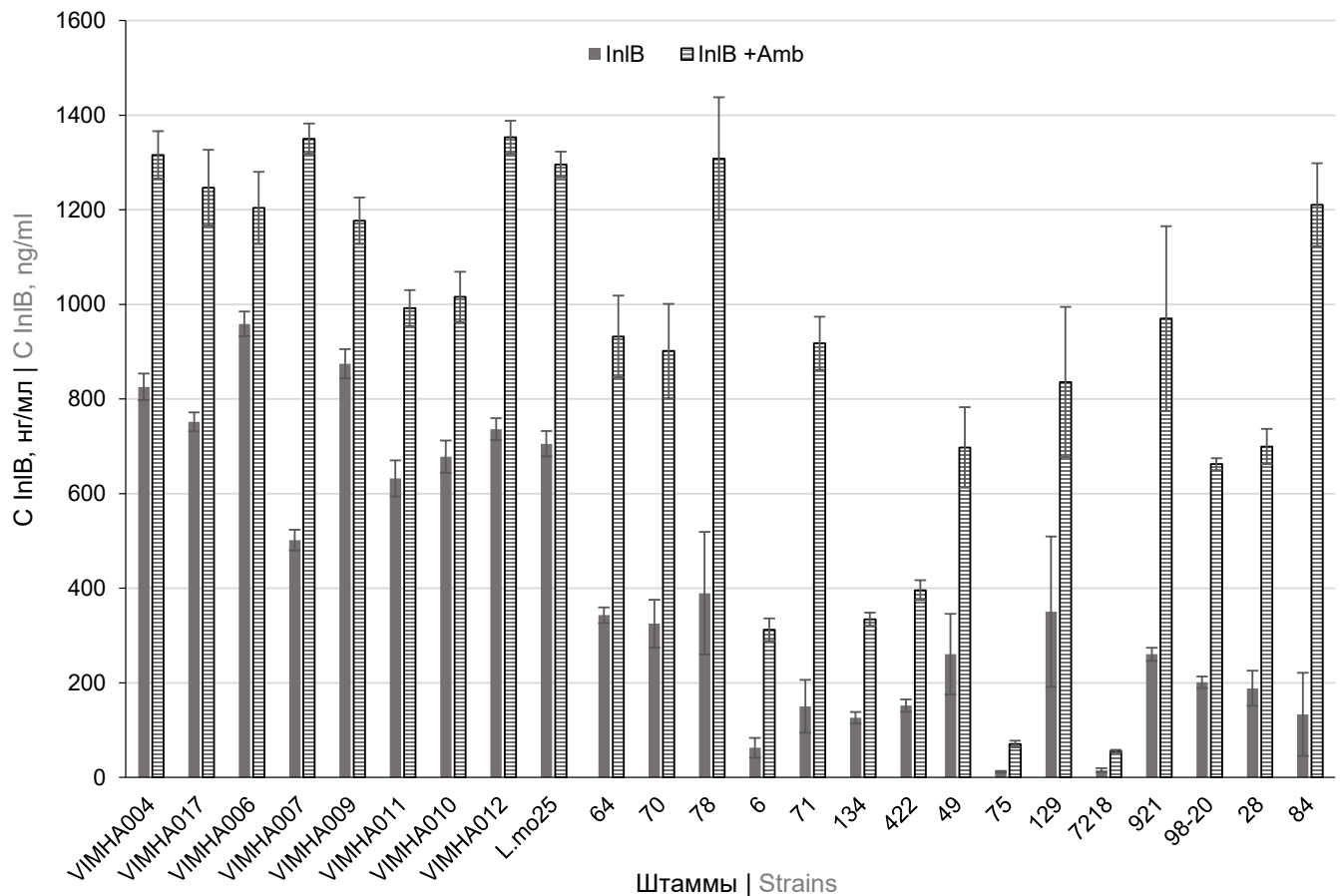


Fig. 5. Levels of InIB isolates belonging to different CCs.

The InIA concentration was measured using the new ELISA test system. Bacteria were grown in a BHI medium with and without 1% Amberlite XAD4.

The production level of major pathogenicity factors can be seen as another mechanism playing a significant role in the virulence potential of a strain [11]. It was previously found that the InIB production level affects the interaction of *L. monocytogenes* with macrophages [28]. In *L. monocytogenes*, the production of pathogenicity factors is controlled by the PrfA protein, which lacks activity in the growth environment outside the host (low temperature, presence of plant sugars and hydrophobic peptides) [22]. This regulatory mechanism is justified, as it eliminates the redundancy of the synthesis of pathogenicity factors for saprotrophic pathogens, when they exist in the abiotic environment. At the same time, high production levels of factors required for crossing the intestinal epithelial barrier should have a positive effect on bacterial virulence. Following this hypothesis, this study demonstrated that the production level of the InIB invasion factor without PrfA activation was 4 times as high in phylogenetic lineage I strains (CC1 and CC2) compared to phylogenetic lineage II strains (CC7, CC9). The InIA production levels, without and with PrfA activation, in CC1, CC2, CC7

isolates were higher than the levels in CC9 isolates. This is consistent with the fact that CC1, CC2, CC7 are most often found in clinical samples in Russia. In CC9 strains, which are most common for food products, the InIA level was 2.5 times as low, except for the L.mo129-3 strain, which demonstrated levels similar to those observed in CC1 and CC2. Thus, our study has shown that strains highly virulent for humans are characterized not only by specific isoforms, but also by increased production of InIA and InIB. Our findings confirm the results obtained by other researchers who have found that clinical isolates differ from food isolates in *inIA* expression levels [11].

Conclusion

In total, our findings are consistent with the epidemiological monitoring data and demonstrate possible mechanisms of the formation of *L. monocytogenes* CCs with different virulence potentials. The obtained results are of fundamental importance; they can also serve as a basis for classifying newly collected isolates into virulent and hypovirulent clones.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Pires S.M., Desta B.N., Mughini-Gras L., et al. Burden of food-borne diseases: think global, act local. *Curr. Opin. Food Sci.* 2021;39:152–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.01.006>
2. Halbedel S., Wilking H., Holzer A., et al. Large nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage, Germany, 2018–2019. *Emerg. Infect. Dis.* 2020;26(7):1456–64. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2607.200225>
3. Rasmussen O.F., Skouboe P., Dons L., et al. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology (Reading)*. 1995;141(Pt. 9):2053–61. DOI: <https://doi.org/10.1099/13500872-141-9-2053>
4. Moura A., Criscuolo A., Pousele H., et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol.* 2016;2(2):1–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>
5. Maury M.M., Tsai Y.H., Charlier C., et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* 2016;48(3):308–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.3501>
6. Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A., et al. Retrospective study of *Listeria monocytogenes* isolated in the territory of inner Eurasia from 1947 to 1999. *Pathogens*. 2019;8(4):184. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8040184>
7. Psareva E.K., Liskova E.A., Razheva I.V., et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food products in the central European part of Russia in 2000–2005 and 2019–2020. *Foods*. 2021;10(11):2790. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10112790>
8. Charlier C., Perrodeau É., Leclercq A., et al. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2017;17(5):510–9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30521-7)
9. Cotter P.D., Draper L.A., Lawton E.M., et al. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* 2008;4(9):e1000144. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000144>
10. Chalenko Y., Kolbasova O., Pivova E., et al. *Listeria monocytogenes* invasion into sheep kidney epithelial cells depends on InlB, and invasion efficiency is modulated by phylogenetically defined InlB isoforms. *Front. Microbiol.* 2022;13:825076. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825076>
11. Severino P., Dussurget O., Vêncio R.Z.N., et al. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(19):6078–88. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02730-06>
12. Kammoun H., Kim M., Hafner L., et al. Listeriosis, a model infection to study host-pathogen interactions *in vivo*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2022;66:11–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.015>
13. Lecuit M., Ohayon H., Braun L., et al. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* 1997;65(12): 5309–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.65.12.5309-5319.1997>
14. Dramsi S., Biswas I., Maguin E., et al. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* 1995;16(2):251–61. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02297.x>
15. Disson O., Grayo S., Huillet E., et al. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*. 2008;455(7216):1114–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07303>
16. Gelbíčová T., Koláčková I., Pantůček R., Karpíšková R. A novel mutation leading to a premature stop codon in InlA of *Listeria monocytogenes* isolated from neonatal listeriosis. *New Microbiol.* 2015;38(2):293–6.
17. Gaballa A., Guariglia-Oropeza V., Wiedmann M., et al. Cross talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra- and intracellular environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2019;83(4):e00034-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-19>
18. Ermolaeva S., Novella S., Vega Y., et al. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Mol. Microbiol.* 2004;52(2):601–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04003.x>
19. Kalinin E.V., Chalenko Y.M., Kezimana P., et al. Combination of growth conditions and InlB-specific dot-immunoassay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *J. Dairy Sci.* 2023;106(3):1638–49. DOI: <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-21997>
20. Maury M.M., Bracq-Dieye H., Huang L., et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.* 2019;10(1):1–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10380-0>
21. Quereda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., et al. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: a trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*. 2021;12(1):2509–45. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1975526>
22. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Popov A.F., et al. Far East scarlet-like fever caused by a few related genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016;22(3): 503–6. DOI: <https://doi.org/10.3201/EID2203.150552>
23. Quereda J.J., Andersson C., Cossart P., et al. Role in virulence of phospholipases, listeriolysin O and listeriolysin S from epidemic *Listeria monocytogenes* using the chicken embryo infection model. *Vet. Res.* 2018;49(1):1–9. DOI: <https://doi.org/10.1186/S13567-017-0496-4>
24. Ермолаева С.А., Зайцева Е.А., Тимченко Н.Ф., Адгамов Р.Р. Варибельность функциональных доменов факторов инвазии как молекулярная основа полигостальности возбудителей сапронозов. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2010;(4):24–8. Ermolaeva S.A., Zaitseva E.A., Timchenko N.F., Adgamov R.R. Variability of functional domains of invasion factors as molecular basis for polyhostality of sapronosis-induced microorganisms. *Pacific Medical Journal.* 2010;(4):24–8. EDN: <https://elibrary.ru/ocqdnb>
25. Chalenko Y.M., Kalinin E.V., Marchenkov V.V., et al. Phylogenetically defined isoforms of *Listeria monocytogenes* invasion factor InlB differently activate intracellular signaling pathways and interact with the receptor gC1q-R. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(17):4138. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20174138>
26. Chalenko Y.M., Slonova D.A., Kechko O.I., et al. Natural isoforms of *Listeria monocytogenes* virulence factor InlB differ in c-Met binding efficiency and differently affect uptake and survival listeria in macrophage. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(8):7256. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24087256>
27. Phelps C.C., Vadia S., Arnett E., et al. Relative roles of listeriolysin O, InlA, and InlB in *Listeria monocytogenes* uptake by host cells. *Infect. Immun.* 2018;86(10):e00555-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00555-18>
28. Чаленко Я.М., Абдулкадиева М.М., Сафарова П.В. и др. Белок INlB, секретируемый *Listeria monocytogenes*, контролирует взаимодействие возбудителя с макрофагами. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2022;(3):5–10. DOI: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2022.034>
Chalenko Y.M., Abdulkadijeva M.M., Safarova P.V., et al. InlB protein secreted by *Listeria monocytogenes* controls the pathogen interaction with macrophages. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2022;(3):5–10. DOI: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.034>

Information about the authors

Egor V. Kalinin[✉] — researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, kalinin.egor@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4478-3225>

Yaroslava M. Chalenko — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7901-5226>

Polina V. Safarova — laboratory researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9051-2664>

Victoria A. Fedorova — laboratory researcher, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0000-9228-3818>

Svetlana A. Ermolaeva — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of ecology of infectious agents, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3396-6816>

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 03.05.2023;
accepted for publication 25.06.2023;
published 28.10.2023

Информация об авторах

Калинин Егор Валерьевич[✉] — н.с. лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, kalinin.egor@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4478-3225>

Чаленко Ярослава Михайловна — к.м.н., с.н.с., лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7901-5226>

Сафарова Полина Вагифовна — лаборант-исследователь, лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9051-2664>

Федорова Виктория Алексеевна — лаборант-исследователь, лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0000-9228-3818>

Ермолаева Светлана Александровна — д.б.н., зав. лаб. экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3396-6816>

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 03.05.2023;
принята к публикации 25.06.2023;
опубликована 28.10.2023



Characteristics of antibiotic resistance of non-typhoidal *Salmonella* circulating in the Russian Federation in the period from 2019 to 2022

Anastasia S. Pavlova[✉], Konstantin V. Kuleshov, Natalia E. Krutova,
Anna N. Guseva, Alexandr T. Podkolzin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Non-typhoidal *Salmonella* make a significant contribution to the incidence of enteric infections and are characterized by an increasing proportion of strains resistant to antimicrobial agents (AMAs), including the first choice antibiotics (cephalosporins III and fluoroquinolones).

The **purpose** of the study is to assess the phenotypic resistance of *Salmonella* to various classes of AMAs and determine the relationship between the phenotypic resistance, serotype, source of isolation and nature of incidence.

Materials and methods. We studied 752 representative strains of *Salmonella* of 2494 strains isolated from various sources (clinical samples, food products, environment) received from 59 regions of Russia in the period from 2019 to 2022. The phenotypic resistance to 22 antibiotics of 11 CLSI classes of AMAs was assessed by broth microdilution method (minimum inhibitory concentration). The diversity of resistance profiles of *Salmonella* serotypes was compared using the Shannon index.

Results. The dominant position in terms of isolation frequency is occupied by the serotypes *Salmonella* Enteritidis, S. Infantis, S. Muenchen, S. Typhimurium, S. Bovismorbificans, which accounted for 64.4% of the studied strains. 543 (72.2%) strains showed resistance to at least one of the tested antibiotics; 193 (25.7%) strains were characterized by multidrug resistance phenotype (MDR). Resistance to AMA classes was characterized by the following distribution: quinolones (61.3%), tetracyclines (28.1%), penicillins (19.1%), β -lactam combination agents (18.6%), folate pathway antagonists (16, 5%), phenicols (10.1%), aminoglycosides (5.6%), cepheims (4.7%), monobactams (4.4%), lipopeptides (3.9%). No penem-resistant strains have been identified. The features of *Salmonella* resistance by AMA classes are shown to depend on the sources of isolation, the *Salmonella* serotype and the nature of the incidence (outbreak and sporadic).

Conclusions. Monitoring of phenotypic antibiotic resistance is an important tool for epidemiological surveillance in order to prevent the spread of bacterial resistance to AMAs.

Keywords: phenotypic resistance, *Salmonella enterica*, antibiotics, *Salmonella* serotypes, sources of isolation

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 83, June 26, 2018).

Funding source. The study was conducted as part of the industry research program of Rospotrebnadzor for the period 2021-2025. (№ НИОКТР АААА-А21-121011990054-5).

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

For citation: Pavlova A.S., Kuleshov K.V., Krutova N.E., Guseva A.N., Podkolzin A.T. Characteristics of antibiotic resistance of non-typhoidal *Salmonella* circulating in the Russian Federation in the period from 2019 to 2022. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):287–301.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-451>

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

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-451>

Характеристика антибиотикорезистентности нетифоидных сальмонелл, циркулирующих на территории Российской Федерации в период с 2019 по 2022 год

Павлова А.С.[✉], Кулешов К.В., Крутова Н.Е., Гусева А.Н., Подколзин А.Т.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Нетифоидные сальмонеллы вносят значительный вклад в заболеваемость кишечными инфекциями и характеризуются возрастанием доли штаммов, резистентных к антимикробным препаратам (АМП), в том числе к современным препаратам выбора (цефалоспорины III и фторхинолоны).

Цель работы — оценка фенотипической резистентности сальмонелл к различным классам АМП и определение связи между фенотипической резистентностью, серотипом, источником изоляции и характером заболеваемости.

Материалы и методы. Исследованы 752 неповторяющихся штамма сальмонелл из 2494 штаммов, выделенных из различных источников (клинический материал, пищевые продукты, окружающая среда), поступивших из 59 регионов России в период с 2019 по 2022 г. Фенотипическая резистентность к 22 антибиотикам из 11 CLSI-классов АМП оценена методом серийных разведений в бульоне (минимальная подавляющая концентрация). Проведено сравнение разнообразия профилей резистентности серотипов сальмонелл с использованием индекса Шеннона.

Результаты. Доминирующее положение по частоте изоляции занимают серотипы *Salmonella* Enteritidis, S. Infantis, S. Muenchen, S. Typhimurium, S. Bovismorbificans, на которые приходилось 64,4% исследованных штаммов. Устойчивость по меньшей мере к одному из тестируемых антибиотиков проявляли 543 (72,2%) штамма, множественной лекарственной устойчивостью характеризовались 193 (25,7%) штамма. Резистентность к классам АМП характеризовалась следующим распределением: хинолоны (61,3%), тетрациклины (28,1%), пенициллины (19,1%), β-лактамы комбинированные препараты (18,6%), антагонисты фолатного пути (16,5%), фениколы (10,1%), аминогликозиды (5,6%), цефемы (4,7%), монобактамы (4,4%), липопептиды (3,9%). Резистентных штаммов к пенициллинам не выявлено. Показаны особенности резистентности сальмонелл по классам АМП в зависимости от источников выделения, серотипа сальмонелл и характера заболеваемости (групповая и спорадическая).

Выводы. Мониторинг фенотипической антибиотикорезистентности является важным инструментом эпидемиологического надзора в целях профилактики распространения резистентности бактерий к АМП.

Ключевые слова: фенотипическая резистентность, *Salmonella enterica*, антибиотики, серотипы сальмонелл, источники выделения

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 83 от 26.06.2018).

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: Павлова А.С., Кулешов К.В., Крутова Н.Е., Гусева А.Н., Подколзин А.Т. Характеристика антибиотикорезистентности нетифоидных сальмонелл, циркулирующих на территории Российской Федерации в период с 2019 по 2022 год. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):287–301. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-451> EDN: <https://www.elibrary.ru/tmxvam>

Introduction

Non-typhoidal strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (hereafter referred to as non-typhoidal *Salmonella*) make a significant contribution to the incidence of enteric infections in the world [1, 2]. These strains of *Salmonella* is responsible for 99% of cases of salmonellosis in humans and animals and remains relevant in the formation of outbreak incidence, ranking 3rd (after acute intestinal infection of viral etiology) by the number outbreaks with the fecal-oral chain of transmission of the infection¹. Despite the downward trend in the incidence in recent years, salmonellosis is still the most frequently reported foodborne zoonosis in Russia. According to the dynamics of incidence in Russia from 2019 to 2021, the incidence rate decreased 1.8 times and amounted to 13.61 per 100 thousand population, while in 2022 it was 17.1 per 100 thousand population¹.

Uncomplicated salmonellosis, as a rule, does not require antibacterial therapy, but it is indicated for the treatment of invasive and severe forms, as well as patients of high-risk groups² (infants, elderly people and patients with weakened immune systems) [3, 4]. For a long time, the commonly used antimicrobial agents (AMAs) were chloramphenicol, ampicillin, and trimethoprim-sulfamethoxazole [5, 6], but in recent years, resistance to these AMAs has increased significantly [7].

Currently, the recommended the first choice antibiotics in the treatment of severe and generalized forms of salmonellosis are third-generation cephalosporins and fluoroquinolones^{3,4}. These AMAs are included in the list of mandatory monitoring for *Salmonella* according to the guidelines of the World Health Organization. The percentage of ciprofloxacin-resistant *Salmonella* strains isolated from humans increased from 12.0% in 2017 to 19.7% in 2020, according to the latest report from the Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS).⁵ At the same time, the percentage of detection of extended-spectrum β -lactamase-producing strains, although remaining at a low level, tends to increase [8].

Monitoring of circulating strains and determination of their AMA resistance profiles are necessary to better understand the epidemiological situation, develop national strategies to eradicate resistant strains,

and develop preventive measures to avoid the formation of reservoirs of infection. At the same time, the organization of monitoring should be based on the One Health principle, which engage close interaction and coordination of different areas. In particular, the organization of monitoring of the phenotypic and molecular genetic characteristics of *Salmonella* both in the human population and in different branches of agriculture, which is especially important to ensure food safety [9].

Comparative analysis of data on antibiotic bacterial resistance of *Salmonella* obtained in Russia in different years involves certain difficulties. One of the main reasons is continuously changing interpretation criteria and methodological approaches to testing for antibiotic bacterial resistance. These changes are occurring around the world, making it difficult to conduct an objective analysis [10]. According to previous studies, the percentage of non-typhoidal *Salmonella* strains resistant to various AMA classes varied significantly across different regions of Russia in different years. Resistance to aminoglycosides was shown by 1–2% to 53.1% of strains, to quinolones — from 0.0% to 59.2%, to penicillins — from 26.4% to 42.0% [11–14]. Another important factor is the limited number of studies in Russia reflecting a comprehensive analysis of the phenotypic resistance of non-typhoidal *Salmonella* strains in terms of the diversity of sources and geography of isolation, as well as the serotype diversity.

The **purpose** of this study was to assess the phenotypic resistance of *Salmonella* to various AMA classes and to determine the relationship between the phenotypic resistance and such parameters as serotype, isolation source and the nature of the incidence (outbreak and sporadic) at which the strains were isolated.

Materials and Methods

Selection of isolates and microbiological studies

In 2019–2022, 2494 strains of non-typhoidal *Salmonella* isolated in 59 regions of Russia from various sources were studied. Among them, 1355 isolates were obtained during the investigation of 113 cases of outbreak incidence of salmonellosis from people and suspected infection transmission factors (food and environment), 1139 isolates were obtained in single cases of salmonellosis from food and the environment. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 83, June 26, 2018).

The studied strains were preliminary cultured to obtain individual colonies on MacConkey medium (CONDA Pronadisa). The species identity was established using biochemical identification systems API[®] 20E (bioMérieux).

¹ On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2022: State report. Moscow; 2023.

² Plumb I., Fields P., Bruce B.B. Salmonellosis (Non-typhoidal). CDC Yellow Book; 2024. Travel-Related Infectious Diseases. URL: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/salmonellosis-non0typhoidal> (access date 7/9/2023).

³ Clinical guidelines. Salmonellosis in adults. M.; 2021.

⁴ The WHO Essential Medicines List Antibiotic Book: improving antibiotic AWaRe (Draft for consultation). Geneva; 2022.

⁵ Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022. Geneva; 2022.

Serological identification

Serological identification of *Salmonella* was carried out using standardized methods according to the Kaufman–White classification scheme with diagnostic polyclonal sera (PETSAL) and monoclonal sera (Sifin).

Genetic typing

Genetic typing was carried out according to the international standardized protocol using restriction enzymes *XbaI* and *BlnI* [15].

Determination of phenotypic resistance

Among all analyzed strains ($n = 2494$), 1522 isolates (61.0%; 95% confidence interval (CI) 59.1–62.9) were determined to be susceptible to AMAs (729 strains from loci of outbreak incidence and 793 from sporadic cases of detecting *Salmonella*) by broth microdilution method with determining the minimum inhibitory concentration of the antibiotic on plates G-I and G-II Mikrolatest®SensiLaTest MIC (Erba Lachema). *Escherichia coli* strain (ATCC 25922) was used as a control strain. The spectrum of AMAs by class, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) classification⁶, included:

- penicillins: ampicillin, piperacillin;
- β -lactam combination agents: ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam;
- cepheems: cefazolin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, cefepime;
- monobactams: aztreonam;
- penems: meropenem, ertapenem;
- aminoglycosides: gentamicin, netilmicin, amikacin, tobramycin;
- lipopeptides: colistin;
- folate pathway antagonists: trimethoprim/sulfamethoxazole;
- quinolones: ciprofloxacin;
- phenicols: chloramphenicol;
- tetracyclines: tetracycline, tigecycline.

The results of susceptibility tests were interpreted in accordance with the current European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing criteria (EUCAST v. 13.0). If a strain showed resistance to at least one antibiotic of a certain class, then the strain was considered resistant to this class.

Due to the lack of interpretation of the minimum inhibitory concentrations of cefazolin, cefuroxime, netilmicin, and tigecycline for *Salmonella* spp., data on these AMAs were not taken into account in the study. The interpretation for tetracycline and chloramphenicol was assessed using epidemiological cut-

off values (ECOFF). In addition, following the World Health Organization recommendations, the ECOFF value of $>8 \mu\text{g/ml}$ was established for colistin when testing *Salmonella* strains belonging to the serotypes S. Enteritidis and S. Dublin⁷.

Strategy for identifying of representative strains and assessing the diversity of resistance profiles

Representative strains were those strains that were characterized by a unique combination of such characteristics as serotype, isolation date, isolation site, isolation source, AMA resistance profile, and genetic subtype. Each event of outbreak incidence, regardless of the isolation source, was represented by one strain or several strains, if strains differing in one or more characteristics were identified within the outbreak. If there was no genetic subtype for a strain, it was not taken into account in the spectrum of characteristics.

To analyze the diversity of resistance profiles of *Salmonella* spp., we used the Shannon diversity index (H). The significance of the difference in Shannon index values (p -level of significance) between two groups of strains, each of which was characterized by a set of resistance profiles with certain frequencies of occurrence, was assessed using modified parametric Student's t -test — Hutcheson's t -test [16].

The 95% CI for the proportion of detected strains according to various criteria was calculated using the BinomCI function according to the Wilson method using the DescTools library package of the R software.

Results

Patterns and characteristics of resistance of *Salmonella* circulating in Russia

Among 1522 isolates tested for antibiotic susceptibility in 2019–2022, 752 representative strains belonging to 69 serotypes were selected. Of these, 153 strains belonged to loci of outbreak incidence and included *Salmonella* strains isolated both from people ($n = 121$) and from suspected sources ($n = 32$), and 599 strains were from sporadic cases of salmonellosis (Table 1). Sporadic strains were divided into three groups according to isolation sources: sporadic incidence — strains isolated from humans ($n = 270$), from food ($n = 239$) and the environmental samples — from various water bodies and wastewater ($n = 90$).

543 (72.2%) strains were resistant to at least one of the tested antibiotics, and 193 (25.7%) strains were characterized by multidrug resistance (MDR). The majority of strains with the MDR phenotype ($n = 120$) were resistant to 4–6 AMA classes, and 6 strains were characterized by the maximum spectrum of resistance — 10 AMA classes out of 11 tested (see **Supplemen-**

⁶ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100 Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2021.

⁷ Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria: Application of a One Health Approach. Geneva; 2017.

Table 1. Distribution of *S. enterica* serotypes in outbreaks and in sporadic cases of *Salmonella* isolation

Serotype (number of outbreaks)	Number of strains	Percentage of strains, %	95% CI
Outbreak cases			
<i>S. Enteritidis</i> (103)	138	90,2	84,4–93,9
<i>S. Abony</i> (2)	5	3,3	1,4–7,4
<i>S. Typhimurium</i> (2)	3	1,9	0,6–5,6
<i>S. Muenchen</i> (2)	2	1,3	0,3–4,6
<i>S. Bareilly</i> (1)	2	1,3	0,3–4,6
<i>S. Infantis</i> (1)	1	0,7	0,1–3,6
<i>S. Stanley</i> (1)	1	0,7	0,1–3,6
<i>S. Braenderup</i> (1)	1	0,7	0,1–3,6
Всего Total	153	100	
Sporadic cases of <i>Salmonella</i> strains isolation			
Sporadic incidence (<i>n</i> = 270)			
<i>S. Enteritidis</i>	55	20,4	16,0–25,6
<i>S. Muenchen</i>	34	12,6	9,2–17,1
<i>S. Typhimurium</i>	17	6,3	4,0–9,9
Другие серотипы Other serotypes	164	60,7	54,8–66,4
Food (<i>n</i> = 239)			
<i>S. Infantis</i>	95	39,7	33,8–46,1
<i>S. Enteritidis</i>	39	16,3	12,2–21,5
<i>S. Typhimurium</i>	11	4,6	2,6–8,1
Другие серотипы Other serotypes	94	39,3	33,4–45,6
Environment (<i>n</i> = 90)			
<i>S. Infantis</i>	13	14,4	8,6–23,2
<i>S. Typhimurium</i>	11	12,2	7,0–20,6
<i>S. Bovismorbificans</i>	10	11,1	6,1–19,3
Другие серотипы Other serotypes	56	62,2	51,9–71,5
Total	599		

tary file in online version on the journal's website, DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-451-1>.

The percentage of resistant strains of the entire collection of studied *Salmonella* to certain AMA classes was characterized by the following distribution: 61.3% (95% CI 57.8–64.7) of the studied strains showed phenotypic resistance to quinolones, 28.1% (95% CI 25.0–31.4) — to tetracyclines, 19.1% (95% CI 16.5–22.1) — to penicillins, 18.6% (95% CI 16.0–21.6) — to β -lactam combination agents, 16.5% (95% CI 14.0–19.3) — to folate pathway antagonists, 10.1% (95% CI 8.2–12.5) — to phenicols, 5.6% (95% CI 4.2–7.5) — to aminoglycosides, 4.7% (95% CI 3.5–6.6) — to cepheids, 4.4% (95% CI 3.1–6.1) — to monobactams, 3.9% (95% CI 2.8–5.6) — to lipopeptides. No penem-resistant strains have been identified.

Strains ($n = 153$) from 113 loci of outbreak incidence of salmonellosis were distributed as follows: in 2019 — 53; in 2020 — 15; in 2021 — 17; in 2022 — 28. 77 (68.1%) outbreaks were characterized by only 1 representative strain. In other cases, 2–4 representative strains were found in the outbreak. The leading serotype in outbreaks was *S. Enteritidis* ($n = 138$). In turn, serotypes *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Muenchen*, *S. Abony*, *S. Stanley*, *S. Braenderup*, and *S. Bareilly* were

related to single cases. The largest proportion (67.3%; 95% CI 59.5–74.2) of strains showed resistance to 1–2 AMA classes (Fig. 1). Strains susceptible to all tested AMAs accounted for 28.1% (95% CI 21.6–35.7), while the proportion of MDR strains was only 4.6% (95% CI 2.2–9.1)

Isolates obtained from humans as well as from other sources, not associated with cases of outbreak incidence of salmonellosis according to epidemiological data, were represented by 599 strains. Each isolation source had its own dominant serotypes. Among sporadic cases, *S. Enteritidis* was predominant (20.4%; 95% CI 16.0–25.6), for food and environment — *S. Infantis* (39.7%; 95% CI 33.8–46.1 and 14.4%; 95% CI 8.6–23.2). At the same time, *S. Typhimurium* was also among the frequently occurring serotypes (Table 1).

It should be noted that among the strains with sporadic incidence and those isolated from the environment, there were approximately equal proportions of those susceptible to AMAs (35.2%; 95% CI 29.7–41.1 and 40%; 95% CI 30.5–50.3), resistant to 1–2 AMA classes (38.1%; 95% CI 32.6–44.1 and 34.4%; 95% CI 25.4–44.7) and strains with an MDR profile (26.7%; 95% CI 21.7–32.2 and 25.6%; 95% CI 17.7–35.4). *Salmonella* isolated from food had the highest proportion of MDR

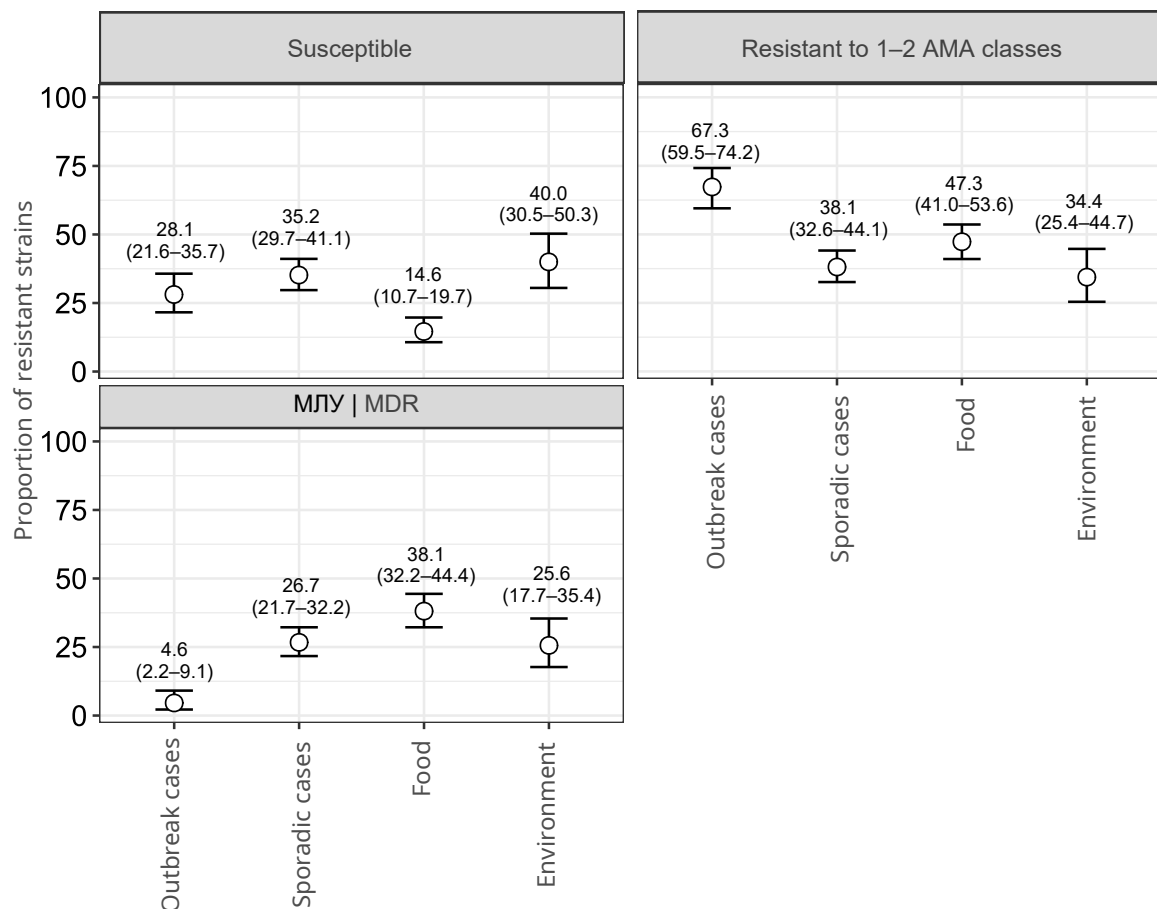


Fig. 1. The proportion of resistant *Salmonella* strains (indicating 95% CI), isolated from various sources and susceptible to all AMAs, resistant to 1–2 AMA classes, resistant to 3 or more AMA classes (MDR).

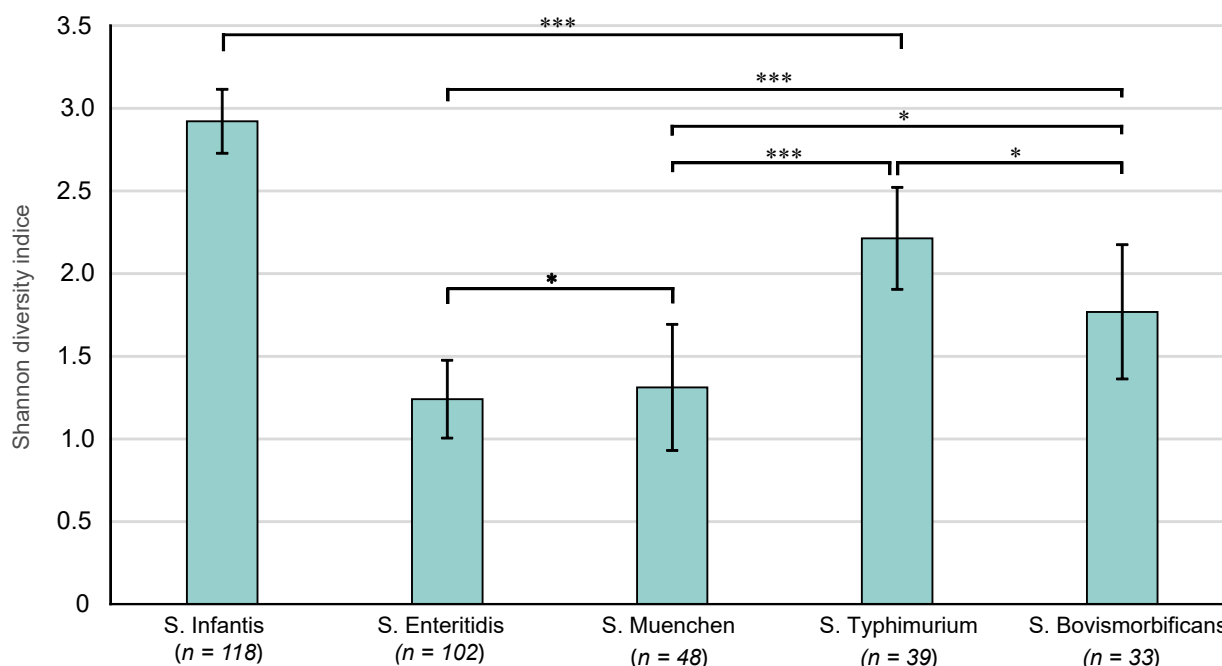


Fig. 2. Distribution of Shannon diversity indices (indicating 95% CI) for *Salmonella* serotypes not associated with outbreaks and with the largest number of resistance profiles.

* — slightly different in diversity ($p > 0.05$); *** — significant difference ($p < 0.05$).

phenotypes (38.1%; 95% CI 32.6–44.1) and the lowest proportion (14.6%; 95% CI 10.7–19.7) of susceptible strains in comparison with other sources (Fig. 1). In addition, strains not associated with outbreak incidence were characterized by a high diversity of antibiotic resistance profiles. We identified 85 different profiles. Frequently occurring serotypes had the largest number of profiles: *S. Enteritidis* ($n = 11$), *S. Infantis* ($n = 31$), *S. Muenchen* ($n = 10$), *S. Typhimurium* ($n = 14$), and *S. Bovismorbificans* ($n = 11$).

Comparison of Shannon diversity indices (H) based on antibiotic resistance profiles of frequently occurring *Salmonella* serotypes not related to outbreak incidence, and evaluation of the significance of differences showed that the diversity in *S. Infantis* strains was significantly higher than in *S. Typhimurium* strains ($p < 0.05$; Fig. 2). At the same time, *S. Typhimurium* did not differ from *S. Bovismorbificans* in the diversity of resistance profiles ($p > 0.05$), but had a significantly ($p < 0.05$) higher diversity than *S. Muenchen*. The diversity for *S. Bovismorbificans* showed a slight difference from *S. Muenchen* ($p > 0.05$), but was significantly ($p < 0.05$) higher compared to the diversity of *S. Enteritidis*. However, *S. Muenchen* and *S. Enteritidis* did not differ by diversity ($p > 0.05$). Thus, *S. Infantis* had the highest diversity of antibiotic resistance profiles ($H = 2.89$; 95% CI 2.70–3.08) compared with other serotypes. However, *S. Enteritidis* had the lowest diversity ($H = 1.24$; 95% CI 1.01–1.46), despite ranking 2nd by the number of strains isolated from sporadic cases, along with *S. Muenchen*.

Comparative evaluation of phenotypic resistance of *Salmonella* strains to AMA classes, isolated from various sources

Strains from all sources were characterized by low resistance to aminoglycosides, lipopeptides, and phenicols, while a significant proportion of strains were characterized by high rates of resistance to quinolones (Fig. 3).

Analyzing the frequency of identified resistant strains among various isolation sources relative to certain AMA classes, it can be seen that the proportion of strains resistant to penicillins, β -lactam combination agents, cepheids, monobactams, folate pathway antagonists, and tetracyclines was significantly higher or, in case of cepheids and monobactams, was found only in the group of sources: “sporadic cases”, “food”, “environment” in comparison with strains from outbreak cases (Fig. 3).

The highest rate of resistance to tetracyclines (49.0%; 95% CI 42.7–55.3) was associated with strains isolated from food products.

The proportion of strains resistant to quinolones and associated with outbreak incidence (68.0%; 95% CI 60.2–74.8) and food products (73.6%; 95% CI 67.7–78.8) was higher compared to other sources.

Comparative evaluation of phenotypic resistance to AMA classes and serotype diversity of *Salmonella*

Analysis of resistance to AMA classes of strains belonging to the most common *Salmonella* serotypes revealed the prevalence of resistant strains among the *S. Typhimurium* and *S. Bovismorbificans* serotypes. In

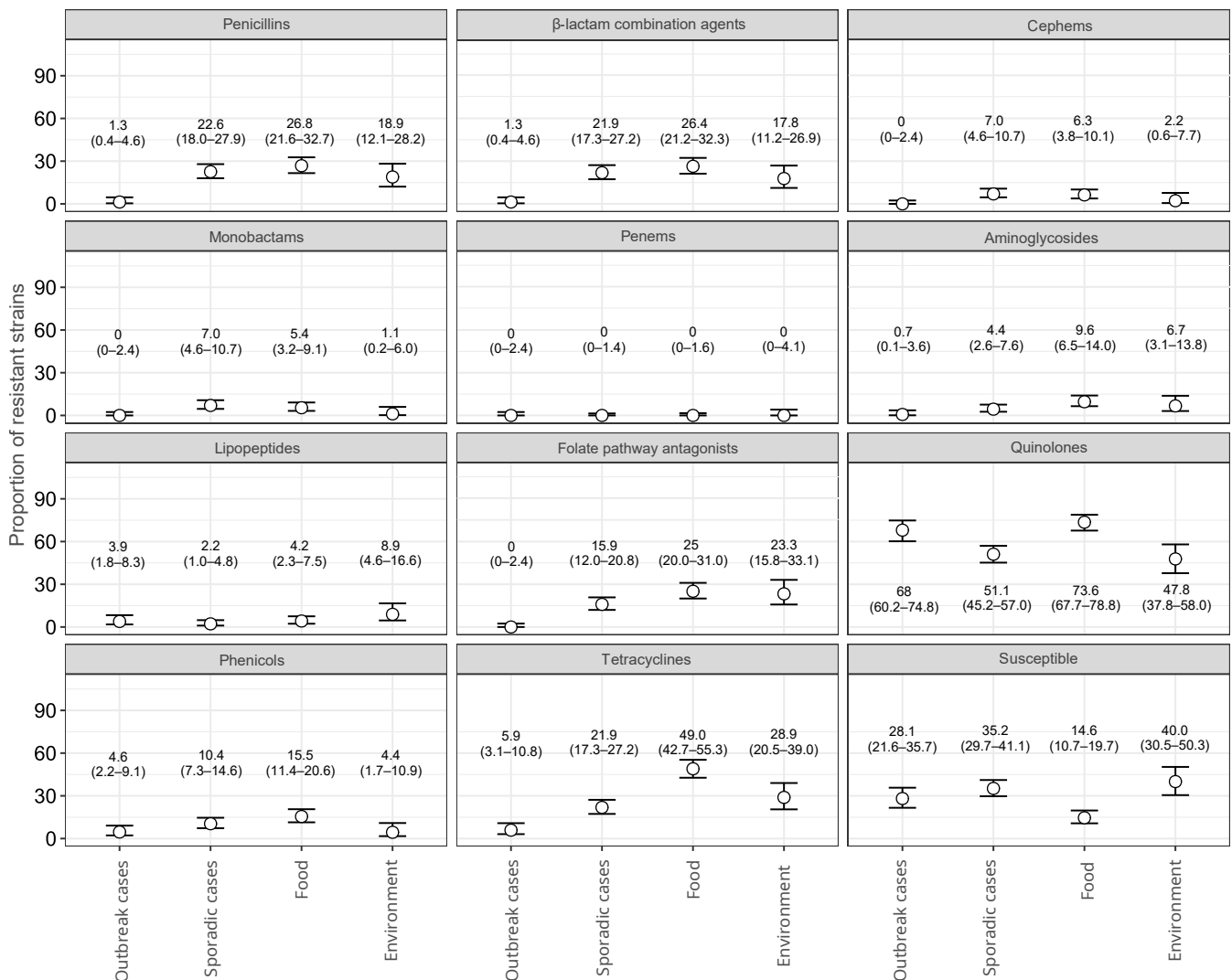


Fig. 3. Proportion of resistant *Salmonella* strains (indicating 95% CI) to different classes of antimicrobial agents from different isolation sources.

particular, the proportion of strains resistant to penicillins was 57.1 and 93.9%, and to β -lactam combination agents — 57.1 and 87.9%, respectively. At the same time, the proportion of strains resistant to folate pathway antagonists and tetracyclines in *S. Bovismorbificans* was at a high level (90.9%; 95% CI 76.4–96.9), and significantly exceeded similar indicators compared to *S. Typhimurium* (9.5%; 95% CI 3.8–22.1 and 47.6%; 95% CI 33.4–62.3, respectively; **Fig. 4**).

S. Infantis strains differed from other serotypes by their high resistance to quinolones (92.4%; 95% CI 86.2–96.0) and phenicolcs (24.4%; 95% CI 17.5–32.8), and also showed increased resistance to folate pathway antagonists (45.4%; 95% CI 36.7–54.3) and tetracyclines (76.5%; 95% CI 68.1–83.2).

It should be noted that a significant proportion of strains of all serotypes showed resistance to quinolones and were divided into 3 groups according to the degree of resistance to this AMA class. The first group with the highest proportion of resistant strains included *S. Infan-*

tis. The second group included *S. Enteritidis* (70.0%; 95% CI 63.9–75.4) and *S. Muenchen* (78.0%; 95% CI 64.8–87.2), among which the proportion of resistant strains was significantly higher than for the third group, which included *S. Typhimurium* (38.1%; 95% CI 25.0–53.2), *S. Bovismorbificans* (33.3%; 95% CI 19.8–50.4), and other serotypes (43.7%; 95% CI 37.8–49.6).

The resistance of strains of all analyzed serotypes to cepheims, monobactams, and lipopeptides did not exceed 10%. The proportion of strains resistant to aminoglycosides also remained low, less than 10%, and only for *S. Infantis* (16.8%; 95% CI 11.2–24.5) and *S. Bovismorbificans* (12.1%; 95% CI 4.8–27.3) this indicator was higher.

Comparison of the diversity of resistance profiles of S. Enteritidis strains isolated from outbreaks and from clinical specimens of sporadic cases

The number of resistance profiles for *S. Enteritidis* strains isolated from outbreaks ($n = 7$) was slight-

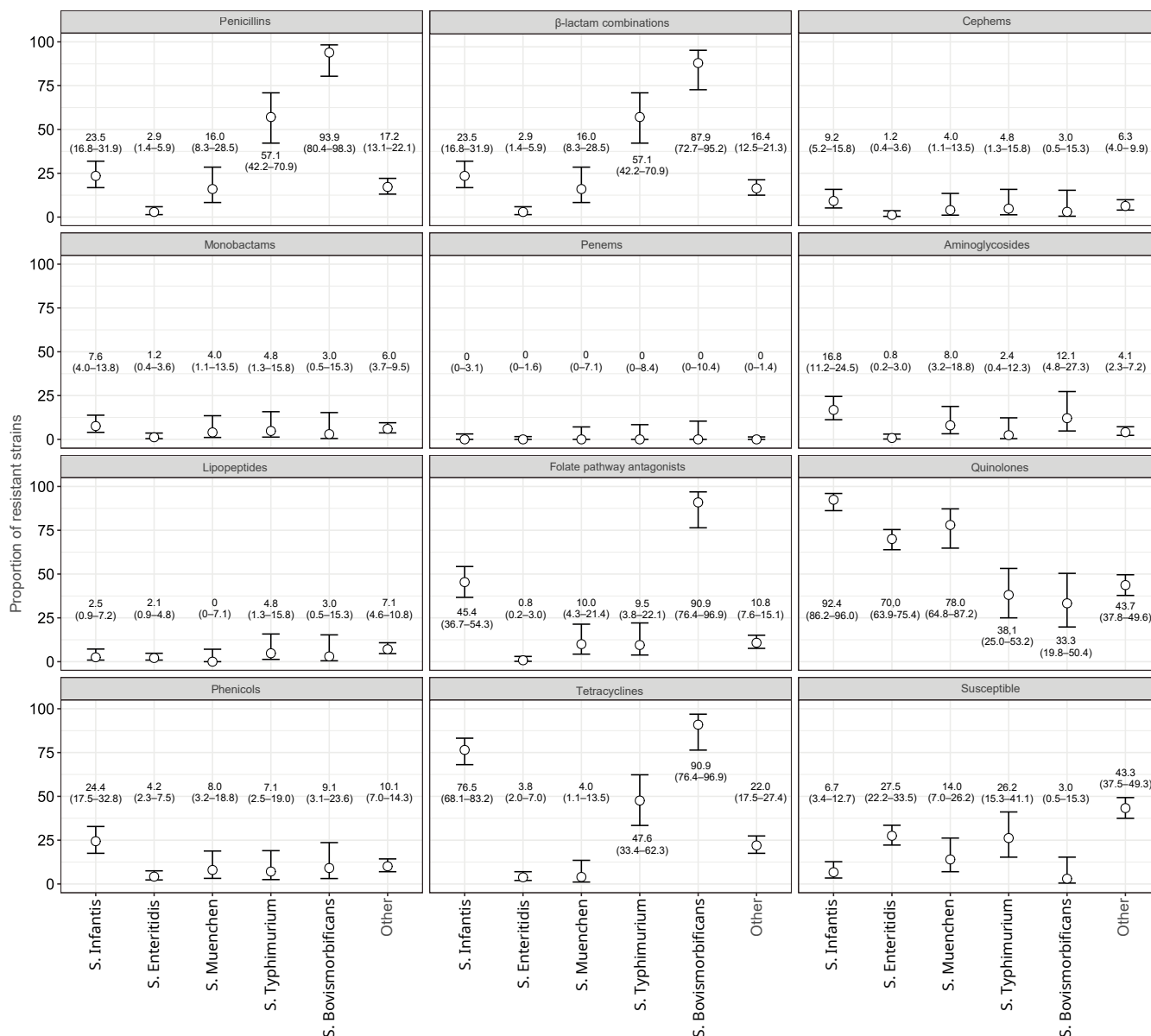


Fig. 4. Proportion of resistant strains of the most common *Salmonella* serotypes (indicating 95% CI) to AMA classes.

ly lower than for sporadic incidence ($n = 9$; **Fig. 5**). Moreover, all *S. Enteritidis* strains were characterized by high resistance to quinolones (70.0%; 95% CI 63.9–75.4) and resistance to other AMA classes at a level below 5% (Fig. 4). Only 27.5% (95% CI 22.2–33.5) were sensitive to all antibiotics tested. Comparison of Shannon diversity indices between groups of *S. Enteritidis* strains isolated from outbreaks ($H = 0.98$; 95% CI 0.81–1.15) and in sporadic incidence ($H = 1.33$; 95% CI 1.03–1.62), showed a significant difference ($p < 0.05$) and a predominance of resistance profiles in the diversity in the case of sporadic incidence (**Table 2**).

Discussion

Monitoring of phenotypic antibiotic bacterial resistance is an important tool for epidemiological sur-

veillance in the fight against the increase in bacterial resistance to AMAs throughout the world, which is aimed at obtaining information about the dynamics of changes in the phenotypic characteristics of socially significant pathogens and developing comprehensive measures to address this issue. Based on an extensive collection of strains, we attempted to characterize in the presented studies the resistance of non-typhoidal *Salmonella* circulating in Russia in recent years.

It is necessary to pay attention to the fact that, in order to create a collection of strains for evaluating antibiotic bacterial resistance, we formed a collection of representative *Salmonella* strains, which, in contrast to a study based on all strains allows us to avoid misconceptions about the detection frequency of a particular resistance profile and obtain objective data. Similar approaches were used before in other studies [17, 18].

Table 2. The number of *Salmonella* strains of a certain AMA resistance profile for the compared groups

Resistance profile	Number of strains
Outbreak cases	
Susceptible	35
Ciprofloxacin	90
Ampicillin, ampicillin/sulbactam, ciprofloxacin, chloramphenicol	1
Ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline	5
Chloramphenicol, tetracycline	2
Colistin, ciprofloxacin	4
Tobramycin, ciprofloxacin	1
Total	138
Sporadic cases	
Susceptible	20
Ciprofloxacin	26
Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam, ciprofloxacin	2
Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam	1
Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, tetracycline	1
Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole	1
Ciprofloxacin, chloramphenicol	2
Chloramphenicol, tetracycline	1
Tobramycin, ciprofloxacin	1
Total	55

An assessment of the serotype diversity of *Salmonella* and phenotypic resistance to AMA classes showed that the dominant position in terms of isolation frequency was occupied by serotypes *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Muenchen*, *S. Typhimurium*, *S. Bovismorbificans*, which accounted for 64.4% of the studied strains. *S. Enteritidis* strains predominated in the sporadic incidence, and *S. Infantis* — in food products and environment. In the meantime, *S. Typhimurium* ranked 3rd by detection frequency in various sources.

The comparison of the levels of resistance to the main AMA classes of the entire collection of strains in our study with the results of previous studies showed

a similar picture. According to S.A. Egorova et al., in St. Petersburg and the Leningrad region in 2014–2018 the percentage of resistant strains of non-typhoidal *Salmonella* averaged 78.6%, and that of strains resistant to quinolones was 63.3% [10], which correlates with the results of our study (72.2 and 61.3%, respectively). At the same time, the proportion of strains resistant to cepheims was almost 2 times lower: 1.6% versus 4.7%. Interestingly, the proportion of identified strains with an MDR phenotype was also 2 times lower — 13.0% versus 25.7% in our study, which may be due to differences in the sample of strains relative to the isolation sources. The detection frequency of *Salmonella* strains with the MDR phenotype in the European Union (28.6%) is close to our average data for the entire collection of strains [19]. According to the report of the National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS),⁸ the proportion of clinical strains with the MDR phenotype among non-typhoidal *Salmonella* in the United States was 9.3% in 2018, which is 2 times higher compared to the proportion of strains with MDR, which belonged to outbreak incidence (4.6%) in our study, but is almost 3 times lower when compared with strains found in sporadic incidence (26.7%). The proportion of clinically resistant strains to certain AMA classes, such as quinolones and cepheims, identified in the USA was 8.5 and 3.5%, respectively; in our study, these figures corresponded to 68.0 and 0.0% for strains with outbreak incidence, and 51.1 and 7.0% for sporadic cases of disease. The significant discrepancy in quinolone resistance is explained, among other things, by differences in the interpretation criteria of CLSI and EUCAST.

The comparative analysis of *Salmonella* strains from different sources made it possible to identify a number of patterns. Resistance levels to many AMA classes (penicillins, β -lactam combination agents, folate pathway antagonists, and tetracyclines) were higher in strains not associated with outbreak incidence. This observation is consistent with earlier studies showing that the acquisition of resistance, particularly through horizontal genes transfer, can reduce the adaptiveness and competitiveness of the microorganisms (fitness of bacteria) having a detrimental effect on the vital physiological processes of the bacterium [20, 21]. Based on our data, this may manifest in a decrease in the virulent properties of *Salmonella* and, as a consequence, a decrease in the epidemic potential.

The highest percentage of tetracycline-resistant strains was found in food products, and environmental strains had the highest frequency of lipopeptide resistance. The only AMA class to which resistance manifested at a high level across different sources were

⁸ Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): human isolates final report, 2019. Atlanta; 2023.

quinolones. The high frequency of quinolone-resistant *Salmonella* strains among various sources can be explained by the widespread use of this group of AMAs in animal husbandry. The chemical stability of this group of antibiotics and their ability to accumulate in various environmental objects in low concentrations leads to the emergence and selection of antibiotic-resistant forms of bacteria most effectively [22, 23]. Moreover, chromosomal mutations associated with intermediate-level quinolone resistance in *S. Enteritidis* do not affect the adaptiveness level of the microorganism [24].

In our study, the percentages of susceptible and resistant strains from sporadic incidence and environmental sources (samples from water bodies and wastewater) were similar, but these isolation sources differed significantly in the diversity of dominant serotypes. According to data published earlier [25, 26], despite the leading position of *S. Enteritidis* among clinical isolates, this serotype was rarely found in wastewater specimens, while *S. Infantis* was the dominant serotype in terms of isolation frequency. The data obtained may indicate poor survival rate of *S. Enteritidis* strains in the environment compared to other serotypes. If we consider the ratio of strains resistant to AMA classes for these isolation sources, we can see that resistance to quinolones, penicillins, β -lactam combination agents and tetracyclines remained at approximately the same level. However, strains isolated from the environment were more resistant to lipopeptides and folate pathway antagonists.

It is noteworthy that the highest percentage of resistant *Salmonella* strains, including MDR, are associated with food. A significant contribution to the resistance to AMAs for this source was made by *S. Infantis* strains with their dominant resistance to quinolones (92.4%), tetracyclines (76.5%), folate pathway antagonists (45.4%), phenicols (24.4 %), penicillins (23.5%) and β -lactam combination agents (23.5%). In addition, this serotype had the highest percentage of strains resistant to third-generation cephalosporins (9.2%), which may indicate the production of β -lactamases. The spread of *S. Infantis* clones with the MDR phenotype is recorded throughout the world [27–29]. According to NARMS, between 2018 and 2019, the number of MDR *Salmonella* isolates obtained from chicken meat product samples increased from 22% to 29%, while the percentage of MDR isolates from retail chicken meat increased from 20% to 32%⁹. A significant contribution to the increase in the spectrum of resistance was made by an increase in the number of detected isolates of *S. Infantis* with the MDR phenotype, which may be a consequence of the use of AMAs

such as ampicillin, co-trimoxazole, chloramphenicol, and tetracycline in human and veterinary medicine [11, 30, 31]. The resistance of *Salmonella* strains isolated from food products to penicillins and tetracyclines in our study (26.8 and 49.0%, respectively) correlates with the data from the European Food Safety Authority (EFSA) [32], in which the resistance of *Salmonella* strains isolated from broiler and turkey carcasses to ampicillin and tetracycline reached 18.8–19.1 and 48.1–50.3%, respectively.

The analysis of the data obtained allowed identifying the resistance features of clinical strains of *Salmonella*, which were detected in different epidemiological situations: outbreak and sporadic incidence in people. Thus, outbreaks of salmonellosis were characterized by the highest percentage of strains resistant to 1–2 AMA classes (67.3%) and the lowest percentage of MDR strains (4.6%). On the contrary, the proportion of MDR strains isolated in sporadic incidence was 5.8 times higher than for outbreak incidence, which is explained by the significant contribution of *S. Typhimurium* strains and other serotypes to the total resistance. Like outbreak strains, sporadic strains were more often resistant to quinolones, which is confirmed by the dominant resistance of the *S. Enteritidis* (70.0%) and *S. Muenchen* (78.0%) serotypes to this AMA class. Resistance to penicillins (22.6%), β -lactam combination agents (21.9%), and tetracyclines (21.9%) was significantly influenced by the presence of *S. Typhimurium* strains, which were more often resistant to these AMA classes. Similar data were published in a joint report by EFSA and the European Center for Disease Prevention and Control in 2022 [32], which stated that a high percentage of MDR *Salmonella* strains (25.4%) isolated from humans in 2019–2020 was justified by the significant contribution of *S. Typhimurium* and *S. Kentucky* resistant strains. High levels of resistance to ampicillin (29.8%), sulfonamides (30.1%), and tetracyclines (31.2%) varied by serotype from low for *S. Enteritidis* to extremely high for *S. Typhimurium* and *S. Kentucky*.

Over the period of many years of monitoring, *S. Enteritidis* remains the main serotype causing outbreak incidence of salmonellosis [33]. Our data demonstrate that both among outbreak and sporadic cases of salmonellosis, the dominant serotype was *S. Enteritidis*. In addition, this serotype occupied the second ranking position (16.3%) when isolated from food products. Comparison of *S. Enteritidis* strains from outbreak and sporadic cases showed a slight difference in the number of resistance profiles and a low level of resistance to many AMA classes, except for quinolones. However, despite the higher number of strains from outbreaks (2.5 times higher than sporadic ones), the diversity of resistance profiles was significantly lower. Another feature of *S. Enteritidis* is the high rate of occurrence of strains with resistance to quinolones, which amounted to 70.0%, which is consistent with the data from studies

⁹ Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): human isolates final report, 2019. Atlanta; 2023. URL: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/2019-narms-update-integrated-report-summary> (дата обращения 07.09.2023)

conducted in St. Petersburg [10], where the resistance of *S. Enteritidis* strains isolated from humans was 71.0%. According to the NARMS surveillance system¹⁰, *S. Enteritidis* strains were the most common serotype among isolates with reduced ciprofloxacin susceptibility in 2019, accounting for 45% of *Salmonella* isolated from humans. It is known that resistance to quinolones in *Salmonella* can be caused by the presence of horizontally (plasmids, transposons, integrons) and vertically (chromosomal mutations) inherited genetic traits [34]. It was shown that the contribution of chromosomal mutations to quinolone resistance for *S. Enteritidis* was significantly higher [35]. The percentage of *Salmonella* strains resistant to quinolones due to single nucleotide substitutions in the region of the DNA gyrase and topoisomerase IV genes reached 97.54%, while the presence of plasmid-mediated resistance was detected only for 1.1% of strains [36].

The second rank by the number of strains isolated from humans was occupied by the *S. Muenchen* serotype (12.6%). It was also the etiological agent in two outbreaks of salmonellosis during the four-year observation period. An increase in the incidence of this serotype is recorded both in individual regions of Russia [37, 38] and in other countries [39]. According to the *Salmonella* Monitoring Reference Center¹¹ for 2021, *S. Muenchen* occupied the 5th ranking position in terms of frequency of isolation from humans and food products and the 6th position — from the environment. It is interesting

to note that in our study, *S. Enteritidis* and *S. Muenchen* had the least diversity of resistance profiles and did not differ significantly from each other.

Conclusion

In the presented study, we have described the phenotypic resistance of *Salmonella* and compared the diversity of resistance profiles of the most common serotypes in Russia, based on a sample of representative strains of non-typhoidal *Salmonella*. A significant contribution to the population of resistant *Salmonella* is made by strains that are not related to the outbreak incidence. Almost half (57.6%) of the studied strains were resistant to at least one AMA class, among which the most frequently detected resistance was to quinolones, tetracyclines, penicillins, and folate pathway antagonists, which have been applied for a long time or are currently used in human and veterinary medicine. In addition, non-typhoidal *Salmonella* isolated from various sources had a wide variety of resistance profiles. Among them, the largest number of strains characterized by resistance were found among serotypes *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, and *S. Bovismorbificans*.

Continuous monitoring of antibiotic resistance and tracking of MDR in *Salmonella* strains plays a key role in addressing the issue of antibiotic resistance and provides valuable information for epidemiological surveillance in order to develop prevention strategies.

¹⁰ Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): human isolates final report, 2019. Atlanta; 2023.

¹¹ Rozhnova S.Sh., Podkolzin A.T., Kuleshov K.V. et al. Information Bulletin of *Salmonella* Monitoring Reference Center No. 34. Moscow; 2022.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Majowicz S.E., Musto J., Scallan E., et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis*. *Clin. Infect. Dis.* 2010;50(6):882–9.
DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/650733>
2. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., et al. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(1):7–15.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
3. Chen H.M., Wang Y., Su L.H., Chiu C.H. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr. Neonatol.* 2013;54(3):147–52.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>
4. Иванов А.С. Современные представления об антибиотикорезистентности и антибактериальной терапии сальмонеллезов. *Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия*. 2009;11(4):305–26. Ivanov A.S. Antimicrobial resistance and therapy of salmonella infections. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;11(4):305–26.
EDN: <https://elibrary.ru/kyiwwn>
5. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. и др. Проблемы устойчивости сальмонелл к клинически значимым антибактериальным препаратам. *Проблемы здоровья и экологии*. 2005;(1):103–10. Tapal'skiy D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V., et al. The problems of resistance of salmonellas to clinically significant antibiotics. *Health and Ecology Issues*. 2005;(1):103–10.
DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2005-2-1-20>
EDN: <https://elibrary.ru/yufosd>
6. Van T.T., Nguyen H.N., Smooker P.M., Coloe P.J. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;154(3):98–106.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.032>
7. Mała L., Popowska M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 2016;67(4):343–58.
8. Павлова А.С., Егорова А.Е., Крутова Н.Е. и др. Распространенность и характеристика БЛРС-продуцирующих штаммов *Salmonella enterica*, циркулирующих на территории России (2016–2020 гг.). *Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия*. 2022;24(3):236–47. Pavlova A.S., Egorova A.E., Krutova N.E., et al. The prevalence and characterization of ESBL-producing strains of *Salmonella enterica* circulating in the territory of the Russian Federation (2016–2020). *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2022;24(3):236–47. DOI: <https://doi.org/10.36488/cmacc.2022.3.236-247>
EDN: <https://elibrary.ru/nukwkwf>
9. Zinsstag J., Schelling E., Waltner-Toews D., Tanner M. From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. *Prev. Vet. Med.* 2011;101(3-4):148–56.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>
10. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В. и др. Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014–2018 гг. в Санкт-Петербурге, Россия. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019;64(10):620–6. Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., et al. Antimicrobial resistance and clinical significant resistance mechanisms of *Salmonella* isolated in 2014–2018 in St. Petersburg, Russia. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019;64(10):620–6.
DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-620-626>
EDN: <https://elibrary.ru/wnxhri>
11. Решетнева И.Т., Перьянова О.В., Дмитриева Г.М., Остапова Т.С. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных на территории Красноярского края. *Гигиена и санитария*. 2015; 94(2):35–8. Reshetneva I.T., Per'yanova O.V., Dmitrieva G.M., Ostapova T.S. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolated in the territory of the Krasnoyarsk region. *Hygiene & Sanitation*. 2015;94(2):35–8.
EDN: <https://elibrary.ru/tphjlx>
12. Кузнецова Н.А., Соловьева А.С., Раков А.В. Чувствительность к антибиотикам у штаммов *Salmonella*. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018;(3):50–8. Kuznetsova N.A., Solov'eva A.S., Rakov A.V. Antibiotic resistance of *Salmonella*. *Health. Medical Ecology. Science*. 2018;(3):50–8. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1488030>
EDN: <https://elibrary.ru/ytdulb>
13. Евмененкова И.Г., Мурач Л.В. Анализ резистентности штаммов *Salmonella* spp. к антибиотикам в Смоленском регионе за 2012–2017 гг. *Смоленский медицинский альманах*. 2018;(1):93–6. Evmenenkova I.G., Murach L.V. Analysis of resistance of strains of *Salmonella* spp. to antibiotics in the Smolensk region for 2012–2017. *Smolensk Medical Almanac*. 2018;(1):93–6. EDN: <https://elibrary.ru/xtfirl>
14. Шитова О.И., Казьянин А.В., Захарова Ю.А. Эпидемиологические особенности, биологическая характеристика и чувствительность к антимикробным препаратам сальмонелл, циркулирующих в Пермском крае. *Сибирский медицинский журнал (г. Томск)*. 2011;26(2-2):116–20. Shitova O.I., Kaz'yanin A.V., Zakharova Yu.A. Epidemiological aspects, biological characteristics and sensitivity to antimicrobial agents of salmonellas circulating in Perm region. *The Siberian Medical Journal*. 2011;26(2-2):116–20.
EDN: <https://elibrary.ru/nupzpv>
15. Peters T.M. Pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiology of food pathogens. *Methods Mol. Biol.* 2009;551:59–70. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_6
16. Hutcheson K. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *J. Theor. Biol.* 1970;29(1):151–4.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(70\)90124-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(70)90124-4)
17. San Martín B., Lapiere L., Toro C., et al. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet. Microbiol.* 2005;110(3-4):239–44.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.07.005>
18. Edelstein M., Pimkin M., Dmitrachenko T., et al. Multiple outbreaks of nosocomial salmonellosis in Russia and Belarus caused by a single clone of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* producing an extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(8):2808–15.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2808-2815.2004>
19. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 2018;16(12):e05500.
DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
20. Gillespie S.H. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2001;17(3):171–6.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00340-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00340-x)
21. Zhang Q., Sahin O., McDermott P.F., Payot S. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes Infect.* 2006;8(7):1972–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.031>
22. Janecko N., Pokludova L., Blahova J., et al. Implications of fluoroquinolone contamination for the aquatic environment — a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 2016;35(11):2647–56.
DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3552>
23. Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Heidelberg: Springer Verlag; 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74664-5>
24. O'Regan E., Quinn T., Frye J.G., et al. Fitness costs and stability of a high-level ciprofloxacin resistance phenotype in *Salmonella enterica* serotype enteritidis: reduced infectivity associated with decreased expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(1):367–74.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00801-09>

25. Masarikova M., Manga I., Cizek A., et al. *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. *Sci. Total Environ.* 2016;542(Pt. A):102–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.069>
26. Koivunen J., Siitonen A., Heinonen-Tanski H. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Res.* 2003;37(3):690–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00305-6](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00305-6)
27. Proietti P.C., Stefanetti V., Musa L., et al. Genetic profiles and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella infantis* strains isolated in Italy in the food chain of broiler meat production. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(11):814. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110814>
28. Bertani A.M.J., Cunha M.P.V., de Carvalho E., et al. Genomic characterization of a multi-drug resistant, CTX-M-65-producing clinical isolate of *Salmonella infantis* isolated in Brazil. *Microbes Infect.* 2022;24(5):104972. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104972>
29. Burnett E., Ishida M., de Janon S., et al. Whole-genome sequencing reveals the presence of the bla_{CTX-M-65} gene in extended-spectrum β-lactamase-producing and multi-drug-resistant clones of *Salmonella* serovar Infantis isolated from broiler chicken environments in the Galapagos islands. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10(3):267. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030267>
30. Шадрова Н.Б., Прунтова О.В., Корчагина Е.А. Антибиотикорезистентность изолятов сальмонелл, выделенных из продуктов животного происхождения. *Ветеринария сегодня*. 2022;11(1):27–34. Shadrova N.B., Pruntova O.V., Korchagina E.A. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from animal products. *Veterinary Science Today*. 2022;11(1):27–34. DOI: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-1-27-34> EDN: <https://elibrary.ru/oioussq>
31. Сердюченко И.В., Пестунова С.А., Калмыков З.Т. и др. Использование химического препарата энрофлоксацина в пчеловодстве. *Ветеринарная патология*. 2020;(2):84–90. Serdyuchenko I.V., Pestunova S.A., Kalmykov Z.T., et al. Use of the enrofloxacin in beekeeping. *Veterinary Pathology*. 2020;(2):84–90. DOI: <https://doi.org/10.25690/VETPAT.2020.72.2.011> EDN: <https://elibrary.ru/hveuxe>
32. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA J.* 2022;20(3):e07209. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>
33. Кулешов К.В., Павлова А.С., Егорова А.Е. и др. Филогенетический анализ изолятов *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар *Enteritidis*, ассоциированных со спорадической и групповой заболеваемостью в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2023;13(2): 76–82. Kuleshov K.V., Pavlova A.S., Egorova A.E., et al. The phylogenomic analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* isolates associated with sporadic and group morbidity in Russia. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2023;13(2):76–82. DOI: <https://doi.org/10.18565/epidem.2023.13.2.76-82>
34. Wasyl D., Hoszowski A., Zajac M. Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in *Salmonella* spp. *Vet. Microbiol.* 2014;171(3-4):307–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.040>
35. Lunn A.D., Fábrega A., Sánchez-Céspedes J., Vila J. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates. *Int. Microbiol.* 2010;13(1):15–20. DOI: <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.107>
36. Wang Y., Liu Y., Lyu N., et al. The temporal dynamics of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* and predominant serovars in China. *Natl Sci. Rev.* 2022;10(3):nwac269. DOI: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwac269>
37. Амплеева Н.П., Павелкина В.Ф., Маркина Е.С. Этиологическая структура сальмонеллеза и чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам. *Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова. Серия: Медицинские науки*. 2023;(1): 5–11. Ampleeva N.P., Pavelkina V.F., Markina E.S. Etiological structure of salmonellosis and sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. *Vestnik of North-Eastern Federal University. Medical Sciences*. 2023;(1):5–11. DOI: <https://doi.org/10.25587/SVFU.2023.30.1.011> EDN: <https://elibrary.ru/ulhbwbk>
38. Тарасенко Т.Т., Косенок Е.В., Семейкина Л.М., Шевердина Ф.Н. О заболеваемости сальмонеллезом в Приморском крае. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2016;(3):134–9. Tarasenko T.T., Kosenok E.V., Semykina L.M., Sheverдина F.N. On the incidence of salmonellosis in the Primorsky region of Russia. *Health. Medical Ecology. Science*. 2016;(3):134–9. DOI: <https://doi.org/10.18411/hmes.d-2016-128> EDN: <https://elibrary.ru/wmmsuf>
39. Bassal R., Davidovich-Cohen M., Yakunin E., et al. Trends in the epidemiology of non-typhoidal salmonellosis in Israel between 2010 and 2021. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2023;20(9):5626. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph20095626>

Information about the authors

Anastasia S. Pavlova[✉] — researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, a.pavlova@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0003-4619-9337>

Konstantin V. Kuleshov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Natalia E. Krutova — junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2925-5376>

Anna N. Guseva — junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7028-0253>

Alexandr T. Podkolzin — D. Sci. (Med.), Deputy director for epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0044-3341>

Author contribution. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, 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 16.07.2023;
accepted for publication 10.10.2023;
published 28.10.2023

Информация об авторах

Павлова Анастасия Сергеевна[✉] — н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, a.pavlova@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0003-4619-9337>

Кулешов Константин Валерьевич — к.б.н., зав. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Крутова Наталья Евгеньевна — м.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2925-5376>

Гусева Анна Николаевна — м.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7028-0253>

Подколзин Александр Тихонович — д.м.н., зам. директора по эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0044-3341>

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

Статья поступила в редакцию 16.07.2023;
принята к публикации 10.10.2023;
опубликована 28.10.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-422>

Comparative evaluation of disinfectant efficacy against biofilm-residing microorganisms

Lyudmila S. Fedorova[✉], Anastasiya V. Ilyakova

Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Bacteria in biofilms (BFs) have increased resistance to antibacterial agents, including disinfectants; however, the efficacy level varies depending on the chosen treatment. Therefore, evaluation of efficacy of main disinfectants against BF-residing microorganisms is of scientific and practical interest.

The **purpose** of the study was to explore the effect of disinfectants from various chemical groups on gram-positive and gram-negative bacteria residing in BFs.

Materials and methods. The effect of the following disinfectants has been evaluated: alkyldimethylbenzylammonium chloride (ADBAC), tertiary amine (TA), polyhexamethylene guanidine chloride (PHMG), hydrogen peroxide (HP), chloramine (CA), dichloroisocyanuric acid sodium salt (Na DCC), sodium hypochlorite (HC), ethyl alcohol (EA), glutaraldehyde (GA) against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-*P* BFs. BFs were grown in 96-well plates at 37°C for 24 hours and then exposed to biocide solutions. The efficacy of disinfectants was evaluated by the number of remaining viable cells and BF relative density.

Results. The analyzed bacterial strains formed moderate BFs; the average number of viable cells in BFs was 6.51 ± 0.19 lg. The viable bacterial cell counts in BFs reduced by more than 4 lg when exposed to HP solutions at a concentration of 6%, Na DCC solution — 0.1% (by active chlorine), HC — 1% (by active chlorine), CA — 1% (by product), PHMG — 0.05%, TA — 1.0 %. The BF density decreased by more than 70%. ADBAC solutions at concentrations of 0.1–1.0%, TA — 0.05%, HP — 3%, Na DCC solution — 0.05% (by active chlorine) caused a 2-lg reduction in viable cell counts in BFs. The efficacy of chlorine-active compounds and HP increased when 0.5% sulfonol was added. GA (0.25–1.00%) and EA (40–70%) solutions were ineffective against BF microorganisms.

Conclusion. A promising potential in combating microbial biofilms is demonstrated by disinfectants from the group of oxidizing agents (chlorine-active and oxygen-containing), TA and PHMG; using ADBAC as an individual compound is ineffective; aldehydes and alcohols are unable to destroy BFs and eliminate microorganisms in them.

Keywords: *biofilms, biocides, disinfectants, antimicrobial resistance*

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: Fedorova L.S., Ilyakova A.V. Comparative evaluation of disinfectant efficacy against biofilm-residing microorganisms. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(5):302–309.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-422>

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

Сравнительная оценка эффективности воздействия дезинфицирующих веществ на микроорганизмы в биоплёнке

Федорова Л.С.[✉], Ильякова А.В.

Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Бактерии в биоплёнке (БП) обладают повышенной устойчивостью к антибактериальным агентам, в том числе дезинфицирующим веществам (ДВ), однако степень эффекта варьирует в зависимости от приложенного воздействия. В связи с этим оценка эффективности основных ДВ в отношении микроорганизмов в БП представляет научный и практический интерес.

Целью исследования было изучение воздействия ДВ различных химических групп на грамположительные и грамотрицательные бактерии в составе БП.

Материалы и методы. Изучено действие ДВ: алкилдиметилбензиламмония хлорида (АДБАХ), третичного амина (ТА), полигексаметиленгуанидина хлорида (ПГМГ), перекиси водорода (ПВ), хлорамина (ХА), натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты (Na-ДХЦК), гипохлорита натрия (ГХ), спирта этилового (ЭС), глутарового альдегида (ГА)) в отношении *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р в БП. БП культивировали в 96-луночных планшетах при 37°C в течение 24 ч, затем воздействовали на них растворами биоцидов. Эффективность воздействия ДВ оценивали на основании регистрации оставшихся жизнеспособных клеток и относительной плотности БП.

Результаты. Изученные штаммы бактерий образовывали умеренную БП, среднее количество жизнеспособных клеток в БП составило $6,51 \pm 0,19$ lg. Количество жизнеспособных клеток бактерий в составе БП снижалось на 4 lg и более под действием растворов ПВ в концентрации 6%, раствора Na-ДХЦК — 0,1% (по активному хлору), ГХ — 1% (по активному хлору), ХА — 1% (по препарату), ПГМГ — 0,05%, ТА — 1,0%. При этом плотность БП снижалась на 70% и более. Растворы АДБАХ в концентрациях 0,1–1,0%, ТА — 0,05%, ПВ — 3%, раствор Na-ДХЦК — 0,05% (по активному хлору) обеспечивали снижение жизнеспособных клеток в БП на 2 lg. Эффективность воздействия хлорактивных соединений и ПВ повышалась при добавлении 0,5% сульфанола. Растворы ГА (0,25–1,00%) и ЭС (40–70%) были неэффективны в отношении микроорганизмов в БП.

Заключение. Для борьбы с микробными плёнками перспективны ДВ из группы окислителей (хлорактивные и кислородсодержащие), ТА и ПГМГ; применение АДБАХ как индивидуального соединения неэффективно; альдегиды и спирты для разрушения БП и уничтожения в ней микроорганизмов не пригодны.

Ключевые слова: биоплёнки, биоциды, дезинфицирующие вещества, резистентность микроорганизмов

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: Федорова Л.С., Ильякова А.В. Сравнительная оценка эффективности воздействия дезинфицирующих веществ на микроорганизмы в биоплёнке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):302–309.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-422>

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

Introduction

The ability of microorganisms to form biofilms on almost any surface is a critical problem in health-care and other areas of human life [1–3]. Biofilms (BFs) are formed through bacterial adhesion to surfaces of objects present in the surrounding environment, being facilitated by high-humidity conditions [3]. BFs are composed of a continuous multilayer of bacterial cells attached to the surface and/or to each other, and embedded in an extracellular polymeric matrix

consisting mainly of polysaccharides, proteins, and nucleic acids [3–5]. The matrix provides structural support to BF, stability and protection of BF-residing microbial cells against dehydration and other adverse environmental impacts [5–8]. Microorganisms make up approximately 10% of the BF dry mass, whereas the matrix can make up 90% [9].

Studies [10–13] have shown that bacteria in BFs are more resistant to disinfectants than their planktonic counterparts. Such resistance is mainly caused by the

poor penetration of chemical compounds (disinfectants) through the extracellular matrix as well as by a lower metabolic activity and slower bacterial growth rates in BF [6, 8]. As a result, disinfection treatment guidelines developed for healthcare settings and employing planktonic cells are ineffective against BF-residing microorganisms, while no established methods used for evaluation of efficacy of disinfectants against BF microorganisms are currently available.

In the meantime, numerous studies have confirmed the presence of dry microbial BFs on various surfaces in healthcare settings [14–16]. Pathogenic microorganisms within BFs can survive on dry surfaces for extended periods and are periodically released as free-living planktonic cells into the environment. BFs, being a reservoir of pathogenic microorganisms, function as a source of dispersion of pathogenic bacteria in the hospital environment [17]. Studies [18–20] have confirmed the important role of microbial BFs, which are found on epidemiologically significant items in healthcare facilities, in the spread and transmission of nosocomial strains of microorganisms and occurrence of healthcare associated infections.

Currently, there are no comprehensive systematic studies on the effect of biocides on microorganisms in BFs and on the ability of the existing detergent formulations and disinfectants to destroy BFs.

Therefore, **the aim** of the study was to evaluate the antimicrobial activity and destructive effect of commonly used disinfectants — active chlorine and oxygen compounds, cationic surface-active agents (SAAs), alcohols, and aldehydes — against test microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P living in BFs.

Materials and methods

Disinfectants based on cationic SAAs, alcohol, hydrogen peroxide, and chlorine-based agents are recommended for disinfection of surfaces in healthcare facilities. Chemical compounds selected for the study were the most typical representatives of active ingredients in disinfectant formulations:

- from the group of cationic SAAs — alkyldimethylbenzylammonium chloride (ADBAC) at concentrations of 0.1–1.0%, polyhexamethylene guanidine chloride (PHMG) — 0.02–0.05%, tertiary alkylamine (TA) — 0.1–1.0%;
- from the group of active oxygen — hydrogen peroxide (HP) at working solution concentrations of 3–6%;
- from the group of active chlorine — chloramine (CA) at working solution concentrations of 0.5–1.0% by product; dichloroisocyanuric acid sodium salt (DCCA) — 0.03–0.10% by active chlorine (AC), sodium hypochlorite (HC) — 0.5–1.0% by AC;

- from the group of alcohols — ethyl alcohol (EA) — 40–70%;
- from the group of aldehydes — glutaraldehyde (GA) — 0.25–1.00%.

In disinfection of surfaces, products based on chlorine and hydrogen peroxide are most often used with the addition of 0.5% detergent to provide additional detergent properties. Therefore, we evaluated the efficacy of chemical compounds of DCCA sodium salt, HC, and HP with the addition of 0.5% sulfonol, which is an anionic SAA.

Reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) — *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P were used as test microorganisms. These reference strains are used for evaluation of bactericidal activity against gram-negative and gram-positive bacteria in accordance with R 4.2.3676-20 – Methods of laboratory research and testing of disinfectants to assess their effectiveness and safety [21].

Bacterial BFs were grown under static conditions in 96-well flat-bottom polystyrene microtitration plates according to O'Toole et al. [22]. The overnight cultures of bacterial strains were adjusted to the 2.0 McFarland standard and diluted 1 : 100 in a tryptic soy broth. 100 µl of bacterial broth cultures were added to the wells of the 96-well flat-bottom plates, and the covered plates were incubated statically at 37°C for 24 hours for BF formation. Then, the wells of the plates were washed three times with phosphate-buffered saline to remove planktonic cells. Then, 100 µl of detergents at different concentrations were added to the test wells, while the control wells were filled with normal saline solution (0.9% NaCl) and left for 30 min; then, 100 µl of a neutralizer containing Tween 80 (3%), saponin (0.3–3.0%), histidine (0.1%), cysteine (0.1%), sodium thiosulfate (0.1%) were added.

The efficacy of disinfectants against the formed BFs was evaluated by measuring the relative optical density of the crystal violet-stained BF matrix. For this purpose, 200 µl of 0.1% aqueous solution of crystal violet was added to the wells and left for 30 min. The BF biomass was measured by the level of extraction of the dye with ethanol, which was measured with a TECAN DESKTOP-4A7U9AL\Infinite M Plex microplate reader at the wavelength of 580 nm in optical density (OD) units.

To assess the viability of cells in BF, 100 µl of phosphate-buffered saline was added to the wells and treated with ultrasound at 37 kHz for 1 min in the Elma Ultrasonic 30S bath (Elma). The cell viability was assessed by the number of colony forming units (CFUs) after plating onto solid growth medium (tryptone soy agar) and by counting CFU/ml after the incubation at 37°C for 24 hours.

The reliability of results was achieved by using 6 wells per 1 test sample and by calculating the average

optical density of the test sample and the decimal logarithm (lg) for CFUs. Then, the average optical density of BF eluate and CFU/ml treated with disinfectants were compared with the untreated control samples. Comparisons were made using Student's t-test [23]. The obtained results were processed using the MS Excel statistical software package. The $p < 0.05$ value was considered statistically significant.

Disinfectants were considered effective against test microorganisms in BFs, if viable cell counts in BFs decreased more than 400 times after the exposure to disinfectants. If the optical density after exposure decreased by more than 70% compared to the control samples, the disinfectants were considered highly effective, while the decrease by 30-70% implied that they had moderate efficacy, and the decrease by less than 30% qualified them as low-effective.

Results

The tested cultures of microorganisms *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *S. aureus* ATCC 6538-P formed BFs with a density of $OD_{580} = 1.50 \pm 0.19$ after 24 hours. The average number of viable cells in BFs was 6.2 ± 0.7 lg.

The treatment of the formed BFs with 0.1% and 1.0% ADBAC solutions decreased the BF density compared to the controls (primary BF) by 48.6 ± 9.5 and $51.2 \pm 8.1\%$ (Fig. 1) and reduced the number of viable cells in BFs by 2 and 3 lg (Fig. 2), respectively.

The effect of TA solutions on BFs demonstrated a direct relationship between the increased concentration of disinfectants and the destruction of the BF matrix. After the formed BFs had been treated with 0.1% and 1.0% TA solutions, the BF density decreased by 58.2 ± 5.5 and $72.5 \pm 8.2\%$, and the number of viable cells decreased by 3 and 4 lg, respectively.

The treatment of *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *S. aureus* ATCC 6538-P BFs with 0.02% and 0.05% PHMG solutions resulted in a significant decrease in the BF density – by 78.1 ± 9.3 and $87.5 \pm 5.9\%$ and

in a reduction in the number of viable cells by more than 5 lg.

The treatment with GA solutions at concentrations of 0.25 and 1.0% caused a slight decrease in the BF density – by 24.66 ± 9.6 and $10.75 \pm 4.5\%$ and an insignificant reduction in the number of microorganisms.

Ethyl alcohol at concentrations of 40% and 70% also had a weak destructive effect on BFs. The increase in concentrations of ethyl alcohol led to a decrease of its efficacy. The treatment with 40% ethyl alcohol decreased the BF density by 20–25%, while the treatment with 70% ethyl alcohol resulted in a 10-12.5% decrease (Fig. 1).

HP working solutions at a concentration of 3% decreased the BF density of *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *S. aureus* ATCC 6538-P by 46.55 ± 9.45 and $54.45 \pm 7.5\%$, causing a reduction in the number of viable cells by 2.8 and 3 lg, respectively (Fig. 1, 2). The increase in HP concentration to 6% resulted in increased efficacy and reduced the number of viable cells by 4.0–4.5 lg.

The treatment of BFs with active chlorine compounds demonstrated that efficacy depends on the disinfectant concentration. The best results were achieved by using 1.0% chloramine solution (by product), 0.1% DCCA sodium salt solution (by AC), and 1.0% sodium hypochlorite solution (by AC) compared to lower concentrations of these disinfectants (Fig. 1, 2).

The treatment with working solutions of 3% HP, 0.03% DCCA (by AC), and 0.5% HC (by AC) supplemented with 0.5% sulfonol detergent increased the antimicrobial effect on BF microorganisms by 40-52% (Fig. 3).

Discussion

The effect of disinfectant solutions on BFs is not completely understood. The action of disinfectants is usually limited to the interaction with the surface layer of BFs, as the matrix prevents molecules of disinfectants from unrestricted diffusion into the deeper layers. There is also evidence that some disinfectants can cause

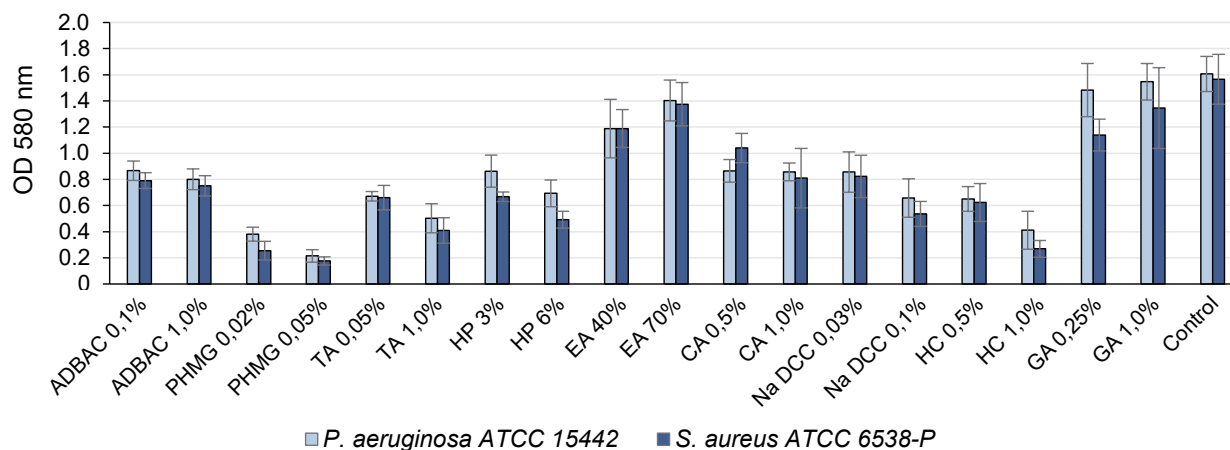


Fig. 1. Comparative assessment of the effect of disinfectants on the density of the formed BFs of *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *S. aureus* ATCC 6538-P.

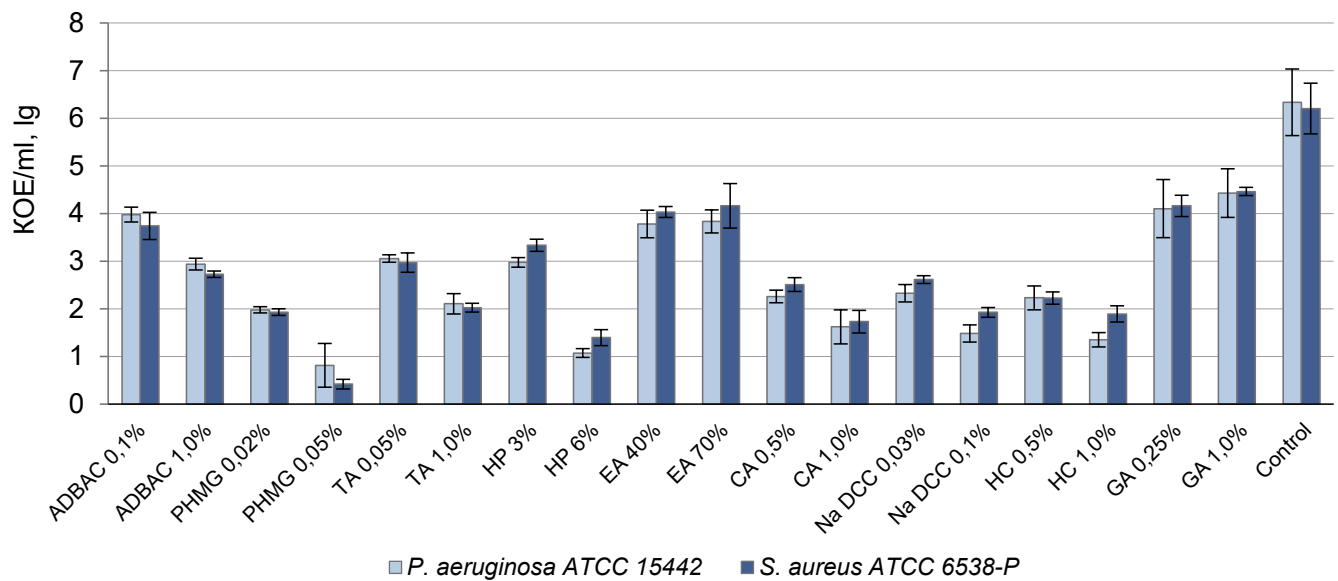


Fig. 2. Comparative assessment of the effect of disinfectants on the viability of *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *S. aureus* ATCC 6538-P cells in BFs.

the opposite effect, leading to BF growth. Such growth promotion is associated with their destruction of surface structures, thus facilitating the inflow of nutrients into BFs [10, 11].

The efficacy of commercial disinfectants has been studied only in relation to planktonic forms of microorganisms, while the data on their biocidal activity against microorganisms growing within BFs are not available. Although multiple studies address the combating strategies against BFs, the disinfectants that could specifically inhibit BF formation and kill bacteria inside BFs, causing their degradation and destroying the matrix have not been found so far. The systemic study of the main disinfectants against gram-negative and gram-positive microorganisms in BFs has been conducted for the first time. The study showed that HP at a concentration of 6%, DCCA sodium salt solution at a concentration of 0.1% (by AC), sodium hypochlorite at a concentration of 1.0% (by AC), chloramine at a concentration of 1.0% (by product), PHMG at a concentration of 0.05%, and TA at a concentration of 1.0% decrease the number of microorganisms in BFs by 4 lg and more, while the BF density is decreased by more than 70%. The need to use biocides from the group of oxidizing agents at higher concentrations is most likely associated with their partial inactivation by biopolymers in BF surface layers. The BF matrix restricts the diffusion through the BF surface to deeper layers and neutralizes some disinfectants, providing the resistance of the microbial BF to the action of these compounds. Since detergents are added to active chlorine compounds to enhance their detergent properties, the effects of solutions of these compounds were studied using 0.5% sulfonol added to them. It was found that the efficacy of active chlorine

compounds and HP was increased, and, most likely, this increase is associated with the increased permeability of the BF matrix due to anionic SAA — sulfonol facilitating the diffusion of disinfectants into BFs due to a reduction in the solution surface tension and, consequently, the improved wetting of the BF surface.

ADBAC demonstrated the lowest efficacy against BF bacteria among cationic SAAs, as negatively charged polysaccharides in BFs can bind positively charged ADBAC molecules, thus protecting BFs against destruction [24]. On the other hand, some studies demonstrate the possibility of using quaternary ammonium compounds for combating microbial BFs, if their effect is enhanced by synergists or enzymes in composite agents [25].

TA demonstrated good efficacy at a concentration of 1%. The TA distinctive feature is the combination of antimicrobial and detergent properties. The presence of free amino groups and the tertiary nitrogen atom generate an alkaline medium, thus contributing to improved antimicrobial activity [25].

PHMG demonstrated bactericidal benefits compared to ADBAC and TA. The significantly decreased BF density and pronounced antimicrobial effect prove that the integrity of the BF structure was significantly impaired due to the destruction of the polysaccharide matrix and the impact on bacteria. The mechanism of this effect has not been uncovered and requires further research.

Glutaraldehyde (0.25–1.00%) and ethyl alcohol (40–70%) solutions had a poor effect on BF destruction and elimination of microorganisms in BFs. Studies [26] have demonstrated that GA reacts with BF amino groups, cross-linking long molecules of biopolymers, thus causing swelling or coagulation of the BF surface

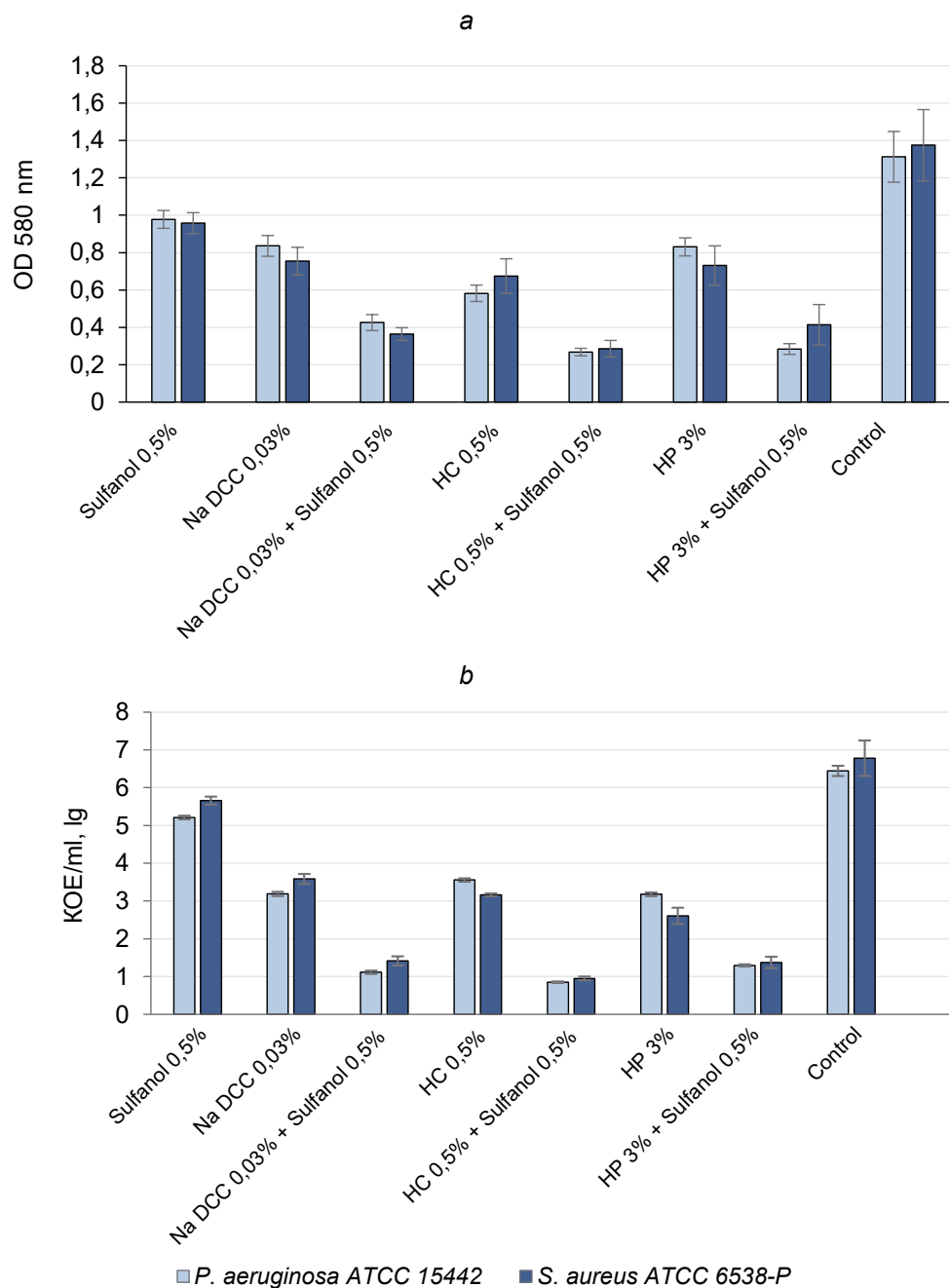


Fig. 3. Comparative assessment of the effect of disinfectants supplemented with the detergent on the BF density (a) and viability (b) of *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *S. aureus* ATCC 6538-P.

layers and preventing further GA diffusion into deeper layers of microbial BFs. Ethyl alcohol owes its low efficacy to a fixing effect and poor penetration of alcohol molecules into protein-rich tissues [27]. Higher alcohol concentrations caused an increase in the BF density.

Conclusion

In combating microbial BFs, good prospects are demonstrated by disinfectants from the group of oxidizing agents (active chlorine and oxygen-containing), TA and PHMG; quaternary ammonium compounds are not effective if used individually; aldehydes and alco-

hols are of no use for BF destruction and elimination of BF-residing microorganisms. The method used for evaluation of efficacy of biocides can be recommended for studies and assessment of the disinfectant activity of agents for combating microbial BFs at the stage of primary selection..

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Algburi A., Comito N., Kashtanov D., et al. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017;83(3):e02508–16.
 DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02508-16>

2. Charron R., Boulanger M., Briandet R., Bridier A. Biofilms as protective cocoons against biocides: from bacterial adaptation to One Health issues. *Microbiology (Reading)*. 2023;169(6):001340. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001340>
3. Vieira-da-Silva B., Castanho M.A.R.B. The structure and matrix dynamics of bacterial biofilms as revealed by antimicrobial peptides' diffusion. *J. Pept. Sci.* 2023;29(6):e3470. DOI: <https://doi.org/10.1002/psc.3470>
4. Тутельян А.В., Юшина Ю.К., Соколова О.В. и др. Образование биологических плёнок микроорганизмов на пищевых производствах. *Вопросы питания*. 2019;88(3)32–43. Tutelyan A.V., Yushina Yu.K., Sokolova O.V., et al. Formation of biological films by microorganisms in food productions. *Problems of Nutrition*. 2019;88(3)32–43. DOI: <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10027> EDN: <https://elibrary.ru/tredji>
5. Hobley L., Harkins C., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015;39(5):649–69. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>
6. Akinbobola A.B., Sherry L., McKay W.G., et al. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro biofilms to high-level peracetic acid disinfection. *J. Hosp. Infect.* 2017;97(2):162–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.06.024>
7. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15(2):167–93. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
8. Hung C., Zhou Y., Pinkner J.S., et al. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *mBio*. 2013;4(5):e00645-13. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00645-13>
9. Günther F., Scherrer M., Kaiser S.J., et al. Comparative testing of disinfectant efficacy on planktonic bacteria and bacterial biofilms using a new assay based on kinetic analysis of metabolic activity. *J. Appl. Microbiol.* 2017;122(3):625–33. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13358>
10. Cochran W.L., McFeters G.A., Stewart P.S. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.* 2000;88(1):22–30. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00825.x>
11. Lineback C.B., Nkemngong C.A., Wu S.T., et al. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2018;7:154. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0447-5>
12. Bae Y.M., Baek S.Y., Lee S.Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;153(3):465–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.017>
13. Chowdhury D., Tahir S., Legge M., et al. Transfer of dry surface biofilm in the healthcare environment: the role of healthcare workers' hands as vehicles. *J. Hosp. Infect.* 2018;100(3):e85–e90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.021>
14. Johani K., Abualsaud D., Costa D.M., et al. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. *J. Infect. Public Health*. 2017;11(3):418–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.10.005>
15. Hu H., Johani K., Gosbell I.B., et al. Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. *J. Hosp. Infect.* 2015;91(1):35–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.05.016>
16. Ledwoch K., Vickery K., Maillard J.Y. Dry surface biofilms: what you need to know. *Br. J. Hosp. Med. (Lond)*. 2022;83(8):1–3. DOI: <https://doi.org/10.12968/hmed.2022.0274>
17. Otter J.A., Vickery K., Walker J.T., et al. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J. Hosp. Infect.* 2015;89(1):16–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.008>
18. Ledwoch K., Dancer S.J., Otter J.A., et al. Beware biofilm! Dry biofilms containing bacterial pathogens on multiple healthcare surfaces; a multi-centre study. *J. Hosp. Infect.* 2018;100(3):e47–e56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.028>
19. Costa D.M., Johani K., Melo D.S., et al. Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Lett. Appl. Microbiol.* 2019;68(4):269–76. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.13127>
20. Руководство Р 4.2.3676-20. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. М.; 2021.
21. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;54:49–79. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
22. Платонов А.Е. *Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы*. М.; 2001. Platonov A.Ye. *Statistical Analysis in Medicine and Biology: Tasks, Terminology, Logic, Computer Methods*. Moscow; 2001. EDN: <https://elibrary.ru/pbdijn>
23. Campanac C., Pineau L., Payard A., et al. Interaction between biocide cationic agents and bacterial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(5):1469–74. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.46.5.1469-1474.2002>
24. Диденко Л.В., Смирнова Т.А., Толордава Э.Р. и др. Влияние третичных алкиламинов на биопленки, образованные *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* (бактериологическое и электронно-микроскопическое исследование). *Дезинфекционное дело*. 2014;(2): 40–5. Didenko L.V., Smirnova T.A., Tolordava E.R., et al. Influence of tertiary alkylamines to biofilms, which were created by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (bacteriological and electron microscopical investigation). *Disinfection Affairs*. 2014;(2):40–5. EDN: <https://elibrary.ru/sgfmhl>
25. Simons C., Walsh S.E., Maillard J.Y., Russel A.D. A note: ortho-phthalaldehyde: proposed mechanism of action of a new antimicrobial agent. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000;31(4):299–302. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00817.x>
26. Silveira M.G., Baumgartner M., Rombouts F.M., Abee T. Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70(5):2748–55. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.70.5.2748-2755.2004>

Information about the authors

Lyudmila S. Fedorova[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of overcoming microbial resistance, Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, fedorova-ls@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2663-0273>

Anastasia V. Ilyakova — Researcher, Laboratory of overcoming microbial resistance, Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1867-3495>

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 31.07.2023;
accepted for publication 12.10.2023;
published 28.10.2023

Информация об авторах

Федорова Людмила Самуиловна[✉] — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией преодоления микробной резистентности НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, fedorova-ls@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2663-0273>

Ильякова Анастасия Васильевна — н.с. лаб. преодоления микробной резистентности НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1867-3495>

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 31.07.2023;
принята к публикации 12.10.2023;
опубликована 28.10.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>

Isolation and genetic analysis of the chikungunya virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes captured in Central America

Georgy M. Ignatyev¹, Alexey S. Oksanich^{1✉}, Elena V. Kazakova², Tatyana G. Samartseva¹, Elena V. Otrasheskaya², Stanislav V. Uyba³, Victor P. Trukhin²

¹I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²St. Petersburg Research Institute for Vaccines and Sera, St. Petersburg, Russia;

³Mechnikov Latin American Institute of Biotechnology, Managua, Nicaragua

Abstract

Introduction. The habitat of mosquitoes belonging to the genera *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. is in South and Central America, including Nicaragua. Monitoring of the spread of mosquito vectors and assessment of the infection with arboviruses can provide information on possible occurrence of new diseases or an increase in the reported cases, changes in the infectivity of viruses for humans due to changes in pathogen transmitters.

The purpose of this study was isolation and identification of arboviruses belonging to the *Flavivirus* and *Alphavirus* genera from *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp. mosquitoes captured in forests of Nicaragua.

Materials and methods. *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp. mosquitoes were captured during the dry season in 2021 in forested areas of Nicaragua in four different locations. Mosquitoes were sorted into pools, each containing 5-8 mosquitoes (236 pools in total). Using the reverse transcription polymerase chain reaction, the pools were tested for the presence of chikungunya (CHIKV), dengue, Zika, and yellow fever viruses. Positive pools were inoculated into the C6/36 cell culture to obtain isolates and for their further sequencing.

Results. The dengue virus was detected only in *Aedes* spp. mosquitoes: in 7 pools — *A. aegypti*, in 1 — *A. albopictus*. CHIKV was also detected only in *Aedes* spp. mosquitoes: in 3 pools — *A. aegypti*, in 1 — *A. albopictus*. The sequencing of nucleotide sequences of 6K, E1, E2, and NS1 genes of CHIKV isolated from *A. albopictus* mosquitoes showed that compared to the similar gene sequences from CHIKV isolates recovered from *A. aegypti* mosquitoes, the 6K gene region contained 4 nucleotide and 4 amino acid substitutions, while the E1 region contained 16 nucleotide substitutions, 10 of them led to amino acid substitutions; the E2 region contained 14 nucleotide and 11 amino acid substitutions; the NS1 region contained 33 nucleotide and 19 amino acid substitutions.

Keywords: *chikungunya*, *dengue*, *arboviruses*, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp., *polymerase chain reaction*, *sequencing*, *isolate*, *nucleotide substitution*, *amino acid substitution*

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Elena Shustova for her help in graphic presentation of materials.

Funding source. The study was funded by RSF grant 22-14-00184.

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

For citation: Ignatyev G.M., Oksanich A.S., Kazakova E.V., Samartseva T.G., Otrasheskaya E.V., Uyba S.V., Trukhin V.P. Isolation and genetic analysis of the chikungunya virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes captured in Central America. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(5):310–318.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>

EDN: <https://www.elibrary.ru/uwgum1>

Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке

Игнатъев Г.М.¹, Оксанич А.С.^{1✉}, Казакова Е.В.², Самарцева Т.Г.¹, Отрашевская Е.В.², Уйба С.В.³, Трухин В.П.²

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия;

³Латиноамериканский институт биотехнологии «Мечников», Манагуа, Республика Никарагуа

Аннотация

Введение. Ареал обитания комаров родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. распространяется на Южную и Центральную Америку, включая Никарагуа. Мониторинг за распространением комаров-переносчиков и оценка их инфицированности арбовирусами могут предоставить информацию о возможности появления новых или увеличении случаев уже регистрируемых заболеваний, изменении инфекционности вирусов для человека при смене переносчика возбудителя.

Целью настоящей работы были выделение и идентификация арбовирусов, принадлежащих к родам *Flavivirus* и *Alphavirus*, из комаров видов *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp., отловленных в лесах Никарагуа.

Материалы и методы. Комары *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp. были отловлены в 2021 г. в сухой сезон в лесной зоне в Никарагуа в четырех разных локациях. Комаров объединяли в пулы по 5–8 особей (всего 236 пулов). Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией пулы анализировали на наличие вирусов Чикунгунья (ВЧ), денге, Зика и жёлтой лихорадки. Положительные пулы инокулировали в культуру клеток С6/36 с целью получения изолятов и их дальнейшего секвенирования.

Результаты. Вирус денге был выявлен только в комарах *Aedes* spp.: в 7 пулах — *A. aegypti*, в 1 — *A. albopictus*. ВЧ также был выявлен только в комарах *Aedes* spp.: в 3 пулах — *A. aegypti*, в 1 — *A. albopictus*. Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* ВЧ, выделенного из комаров *A. albopictus*, показало, что по сравнению с аналогичными последовательностями генов из изолятов ВЧ, выделенных из комаров *A. aegypti*, в области гена белка 6K обнаружено 4 нуклеотидных и столько же аминокислотных замен, в области *E1* — 16 нуклеотидных замен, 10 из которых приводили к аминокислотным заменам, в области *E2* — 14 нуклеотидных и 11 аминокислотных замен, в области *NS1* — 33 нуклеотидные и 19 аминокислотных замен.

Ключевые слова: Чикунгунья, денге, арбовирусы, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp., полимеразная цепная реакция, секвенирование, изолят, нуклеотидная замена, аминокислотная замена

Благодарность. Коллектив авторов выражает благодарность Елене Юрьевне Шустовой за помощь в графическом представлении материалов.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 22-14-00184.

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

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Оксанич А.С., Казакова Е.В., Самарцева Т.Г., Отрашевская Е.В., Уйба С.В., Трухин В.П. Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):310–318.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-354>

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

Introduction

Mosquitoes of the genera *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. are vectors for numerous pathogens causing viral diseases such as dengue fever, Zika fever, yellow fever, chikungunya fever, Venezuelan equine encephalomyelitis, Sindbis fever and belong to families *Flaviviridae* (genus *Flavivirus*) and *Togaviridae* (genus *Alphavirus*) [1–6]. Habitats of mosquitoes belonging to the genera *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. are located in South and Central America, including Nicaragua [2, 3, 7–10]. The monitoring of the spread of mosquito vectors and the assessment of their infectivity can provide information on possible occurrence of new diseases or an increase in the reported cases, while the change of a pathogen's vector can cause changes in the infectivity of viruses for humans [5]. Isolation of viruses directly from vectors captured in their natural habitats and exploration of isolated strains are essential for development of diagnostic tools, prevention and treatment of diseases caused by alphaviruses and flaviviruses.

The purpose of this study was isolation and identification of arboviruses belonging to the genera *Flavivirus* and *Alphavirus* from *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Culiseta* spp., *Culex* spp. mosquitoes captured in forests of Nicaragua.

Materials and methods

Mosquitoes

Mosquitoes were captured during the dry season in 2021 in a forested area of Nicaragua in four different locations having the following coordinates:

- location 1 — 12.325527N 85.974662W;
- location 2 — 12.323326N 85.974275W;
- location 3 — 11.908210N 85.932490W;
- location 4 — 11.903555N 85.938758W.

Representatives of the genera *Aedes* spp. (*A. albopictus*, *A. aegypti*), *Culiseta* spp., and *Culex* spp. were among the captured mosquitoes. After their species had

been identified, mosquitoes were sorted into pools of 5–8 insects of the same species captured in the same location. A total of 236 pools were formed. Each pool was homogenized in 300 µl of the Leibovitz L-15 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific), pH 7.4, using ceramic beads and the SpeedMill Plus homogenizer (Analytik Jena) to obtain the suspension. 140 µl of homogenate from each pool was used for RNA extraction, which was performed using a QIAamp Viral RNA reagent kit (Qiagen). The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using protocols for each pathogen. The pools tested positive for any of the viruses under study were used for subsequent isolation of the virus on cell cultures.

Virus isolation

The remaining mosquito suspension (200 µl) was filtered through the 0.45 µm PES filter. The obtained filtrate was used to infect the monolayer of C6/36 cells grown in 24-well plates. The inoculation was performed in 100 µl using the stock and dilution 1:10. Seven days after the infection, 100 µl of the supernatant were used for the next passage. A total of 5 successive passages were conducted. After the infection, the cells were examined daily for the presence of any signs of a cytopathic effect.

Molecular and genetic study

The RT-PCR-based molecular and genetic study was performed using the following procedure. The 140 µl mosquito suspension was used to extract RNA using a QIAamp Viral RNA reagent kit (Qiagen) in accordance with the instructions of the manufacturer. Then using the reverse primer pNS1CHVrev2-3 for the chikungunya virus (CHIKV; the *NS1* gene region); the mixture of reverse primers for the dengue virus panDVrev1 and panDVrev2 (the 3'-UTR region), which were common for all 4 types of the virus (Table 1); the reverse primer for the Zika virus pZVrev [9]; the reverse primer for yellow fever virus pYFVrev (Table 2)

Table 1. Nucleotide sequences of primers and probes for detection of CHIKV and dengue virus RNA in collected samples using real-time RT-PCR

Oligonucleotide	Nucleotide sequence, 5'–3'	PCR product size
CHIKV (the NS1 gene region)		
pNS1CHVfor	GTGTGCTGTTCTCAGTAGGGTCAACG	218 bp
pNS1CHVrev	GTCTGCGTGGTGGGTTACCGC	
zNS1CHVfor	FAM-GGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCCC-BHQ1	
Dengue virus (the 3'-UTR region)		
panDVfor	GACTAGYGGTTAGAGGAGACCC	190 bp
panDVrev1	CGTTCTGTGCCTGGAATGATG	
panDVrev2	CGCTCTGTGCCTGGATTGATG	
zDVfor	FAM-GCATATTGACGCTGGGARAGACCAGAG-BHQ1	

Note. Y — either C or T; R — either A or G.

Table 2. Nucleotide sequences of primers for amplification of Zika and yellow fever virus RNA using RT-PCR and electrophoresis detection

Oligonucleotide	Nucleotide sequence, 5'–3'	PCR product size
Zika (the NS5 gene region)		
pZVfor	CCGCGCCATCTGGTATATGT	450 bp
pZVrev	CTCCACTGACTGCCATTTCGT	
Yellow fever (the E gene region)		
pYFVfor	TACCCTGGAGCAAGACAAGT	465 bp
pYFVrev	GCTTTTCATACCCAATGAA	

[11] and a reagent kit for RT (Syntol), the cDNA was generated from the viral RNA template using an RT reaction. During the first stage, 2 µl of reverse primers (10 pmol/µl) were mixed with 6 µl of the extracted RNA; then, the mixture was heated at 95°C for 5 min. Then, the tubes were cooled down at the room temperature for 2 min and 22 µl of the mixture were added for RT (9 µl of deionized water, 12 µl of the 2.5-fold buffer for RT (Syntol), 1 µl of MMLV-reverse transcriptase (Syntol)) and were incubated at 42°C for 30 min. The mixture was heated at 95°C for 5 min to inactivate the reverse transcriptase.

For the Zika virus and yellow fever virus, agarose gel electrophoresis detection of PCR amplicons was performed using non-original primers from other researchers [9, 11], which are listed in Table 2. The amplification was performed in accordance with the following program: 95°C — 1 min 30 sec; 30 cycles: 95°C — 20 sec, 55°C — 15 sec, 72°C — 30 sec; 72°C — 10 min.

The real-time PCR was performed for CHIKV and dengue viruses using original primers and probes. The *DTprime* instrument (DNA-Technology) was used for amplification following the program: 95°C — 1 min 30 sec; 40 cycles: 95°C – 15 sec, 55°C – 40 sec.

The in-house designed oligonucleotides and the procedure described previously were used for generating CHIKV *6K*, *E1*, *E2*, and *NS1* gene fragments and their sequencing [12].

Prior to sequencing, all the PCR products were gel-purified using a Cleanup Standard reagent kit (#BC022, Evrogen) and cloned the pGEM-T Easy vector (Promega) in accordance with the manufacturer's instructions. Then, the clones were selected, plasmids were extracted, and the Sanger sequencing was performed using standard primers for sequencing T7 and SP6. The obtained nucleotide sequences were aligned using the MEGA11 software¹.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic analysis was conducted using the molecular dating method, the BEAST v. 1.10.4

software package and the associated software suite BEAUti v. 1.10.4². When constructing trees, we used the HKY³ nucleotide substitution algorithm with a strict molecular clock. The analysis included 10 million trees, every 1,000th tree was selected. The MEGA11 software was used for tree construction. The multiple alignment was performed using genetic sequences of genome fragments (*E2*, *6K*, *E1*) of CHIKVs isolated from mosquitoes (30 sequences) in different regions of the world. The position in the genome fragment, which was used for the phylogenetic analysis, was 8574–11 303 bp (the positions are shown for the prototype strain isolated in 1959, GenBank KX262990). The phylogenetic tree was extended with 8 nucleotide sequences of CHIKV isolated from humans, 3 of which were obtained from patients in Nicaragua in 2014 and 2015, and 4 of them were reference sequences of the virus.

The infectivity of mosquitoes was measured following the previously described procedure [10, 13].

Results and discussion

The mosquitoes captured in four locations represented three genera *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. As can be seen from Table 3, the best represented genus was *Aedes* spp. Accounting for 954 mosquitoes: 604 (67%) mosquitoes belonged to *A. aegypti*, 314 (33%) mosquitoes belonged to *A. albopictus*. Out of 105 pools of *A. aegypti* mosquitoes, 7 pools were tested positive for the dengue virus RNA, while 3 pools were tested positive for CHIKV RNA. Zika virus and yellow fever virus RNAs were not detected. No simultaneous detection of CHIKV RNA and dengue virus RNA was recorded. Out of 54 pools of *A. albopictus* mosquitoes, the dengue virus RNA was detected in 1 pool and the CHIKV RNA was also detected in 1 pool. Zika virus and yellow fever virus RNAs were also not detected. The simultaneous detection of CHIKV and dengue virus RNA was not reported. No RNA of the tested viru-

¹ Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7):3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120

² Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2005;22(5):1185–1192. DOI: 10.1093/molbev/msi103

³ Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 1985;22(2):160–174. DOI: 10.1007/BF02101694

Table 3. Genus and number of captured mosquitoes

Mosquito species	Number of mosquitoes	Number of pools	PCR results (positive/negative)			
			dengue virus	CHIKV	yellow fever virus	Zika virus
<i>Aedes</i> spp.	954	159	8/151	4/155	0/159	0/159
<i>A. aegypti</i>	640	105	7/98	3/102	0/105	0/105
<i>A. albopictus</i>	314	54	1/53	1/53	0/54	0/54
<i>Culex</i> spp.	278	46	0/46	0/46	0/46	0/46
<i>Culiseta</i> spp.	188	31	0/31	0/31	0/31	0/31

ses was detected in 46 pools of mosquitoes belonging to the genus *Culex* spp. and in 31 pools of mosquitoes representing the genus *Culiseta* spp.

A. albopictus mosquitoes from the CHIKV positive pool were captured in location 1 and *A. aegypti* mosquitoes from the positive pools were captured in location 4. The dengue virus RNA was detected in pools of *A. aegypti* mosquitoes captured in location 2, and *Aedes albopictus* mosquitoes captured in location 2.

The minimum infection rate for *A. aegypti* mosquitoes for the dengue virus was 10.0 and for CHIKV – 4.6. The minimum infection rate for *A. albopictus* mosquitoes for the dengue virus and CHIKV was 3.0. The obtained results lead to the assumption that mosquitoes of the genus *Aedes* spp. were infected with the dengue virus and CHIKV.

The minimum infection rate for mosquitoes, undoubtedly, is an important variable; however, it depends on the number of captured mosquitoes (the size of the studied subset) and the number of mosquitoes in the pool, thus affecting the sensitivity of the employed method. In some studies of the minimum infection rate among mosquitoes infected with alphaviruses and flaviviruses, the rate ranged from 0 to 12, thus implying a potential risk of infection with this virus transmitted by the particular mosquitoes [10, 13]. The possible coinfection with dengue and chikungunya viruses was described earlier; the examination of serological markers of flaviviruses and alphaviruses demonstrated the presence of antibodies against the dengue virus and CHIKV [9, 14]. The RT-PCR positive mosquito pools – 8 pools with the dengue virus and 4 pools with CHIKV were used to isolate viruses.

C6/36 cells were used to isolate viruses from the mosquito pools. Each pool was put through 5 successive passages. In the cells infected with samples containing CHIKV (based on the RT-PCR results), the disturbance of the cell monolayer – the development of a cytopathic effect – was observed in the 2nd – 3rd passages. In the 5th passage, the 100% cytopathic effect was observed after 72 hours. In the samples containing dengue viruses (based on the PCR results), the cytopathic effect was not as pronounced. In each passage, the authenticity of the isolates and the absence of cross-contamination were verified using RT-PCR. After the isolation had been completed, the isolates were sequenced. The

resulting isolates contained CHIKV and dengue viruses types 1 and 2. In isolates containing dengue viruses, only the type of the virus was identified due to the short length of PCR product fragments.

As can be seen from the electropherogram of amplicons (**Fig. 1**) obtained using universal primers for all the 4 types of the dengue virus, the amplification produces 2 amplicons 190 and 106 bp long. The sequencing of fragments showed that both of them were specific [15, 16].

The sequencing of nucleotide sequences of CHIKV 6K, E1, E2, and NS1 genes from *A. albopictus* mosquitoes (1 pool, location 1) showed that it was the same strain, which we had isolated in the same location in 2018 [12]. Compared to the similar gene sequences from the CHIKV isolates obtained from *A. aegypti* mosquitoes (3 pools, location 4), the 6K gene region had 4 nucleotide and 4 amino acid substitutions; the E1 region had 16 nucleotide substitutions, 10 of which resulted in amino acid substitutions; the E2 region had 14 nucleotide and 11 amino acid substitutions and the NS1 region had 33 nucleotide and 19 amino acid substitutions (**Table 4**). Three isolates from *A. aegypti* mosquitoes did not have any amino acid substitutions relative

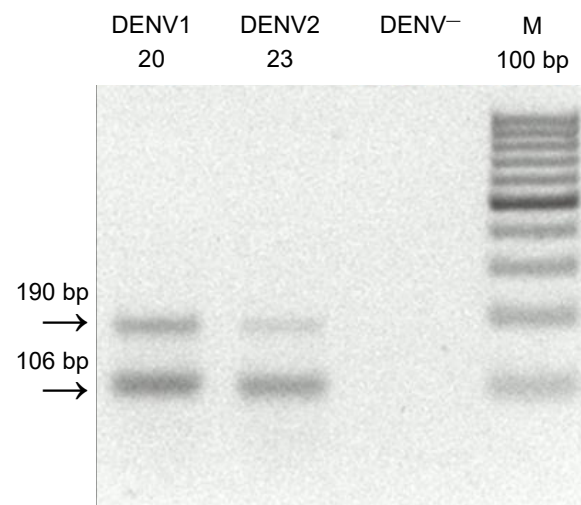


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis (2%) of PCR products. DENV1 20 and DENV2 23 — amplicons of dengue viruses types 1 and 2 from 20 and 23 pools, respectively; DENV⁻ — negative PCR controls for the dengue virus; M 100 bp — DNA molecular weight marker.

to each other. The isolated strain was deposited in the genetic sequence database of GenBank (NCBI) with accession number OQ320495.

The analysis of the nucleotide and amino acid substitutions showed that they, to a greater degree, differed from the known substitutions typical of the studied region [7]. Such significant differences can be explained by the fact that most of the CHIKV isolates were obtained by other researchers from sera of infected individuals and only rarely from mosquitoes. In addition, most of the isolates were obtained from mosquitoes captured in urban areas and rarely – in remote rural areas like mosquitoes in this study. The differences in nucleotide sequences of CHIKV isolates in all the 4 genes

can also be explained by differences in locations of captured mosquitoes and by different mosquito species that carried the detected virus.

Thus, CHIKV and dengue type 1 and type 2 viruses were detected when isolating viruses from *Aedes* spp., *Culex* spp. and *Culiseta* spp. mosquitoes captured in forests in Nicaragua. The analysis of some CHIKV genes demonstrated high genetic diversity among viruses isolated from *A. albopictus* and *A. aegypti* mosquitoes.

The phylogenetic analysis of the nucleotide sequences (Fig. 2) showed that the closest relative of the isolated CHIKV is the virus isolated from a human in Africa in 2011 (GenBank KJ679577). The emergence of

Table 4. Nucleotide and amino acid substitutions in 6K, E1, E2, and NS1 gene regions in CHIKV isolates recovered from *A. albopictus* and *A. aegypti* mosquitoes captured in different locations in Nicaragua

Substitutions <i>A. albopictus</i> > <i>A. aegypti</i>							
6K protein gene		E1 protein gene		E2 protein gene		NS1 protein gene	
N	A	N	A	N	A	N	A
A37G	E13K	G28A	T10A	C145T	H49Y	C7T	P3S
A54T	F18L	T79A	M27L	A406G	K136E	T21C	–
C107T	L36P	G150A	–	T541G	C181G	C253T	R85C
T176C	A59V	C441T	–	T543C	C181G	A293G	K98R
		T443C	A148V	A545G	Q182R	G307A	A103T
		C579G	–	C558T	–	T389C	M130T
		G633A	–	G662A	R221K	T489C	–
		T683C	T228M	A760G	M254V	T498G	–
		C852T	–	G775A	G259R	A540G	–
		G955A	K319E	C914T	A305V	T581C	L194S
		G968T	I323S	C944T	A315V	A699G	–
		G979A	K327E	G1019A	R340H	A890G	Y297C
		A1081G	A361T	T1082C	V361A	C1014T	–
		C1106T	V369A	G1146A	–	A1047G	–
		C1217T	V406A			A1067G	Q356R
		T1308C	–			T1085C	L362P
						G1114A	A372T
						T1176C	–
						C1249T	R417C
						T1366A	W456R
						G1489A	A497T
						G1491A	A497T
						A1493T	E498V
						G1512A	–
						A1580T	E527V
						C1587T	–
						A1619C	N540T
						G1622C	R541P
						A1623G	R541P
						T1625G	I542R
						T1626A	I542R
						C1627G	P543G
						C1628G	P543G
Σ H: 4	Σ A: 4	Σ H: 16	Σ A: 10	Σ H: 14	Σ A: 11	Σ H: 33	Σ A: 19

Note. N – nucleotide substitution; A – amino acid substitution. The position of a nucleotide or amino acid substitution is shown from the beginning of a gene.

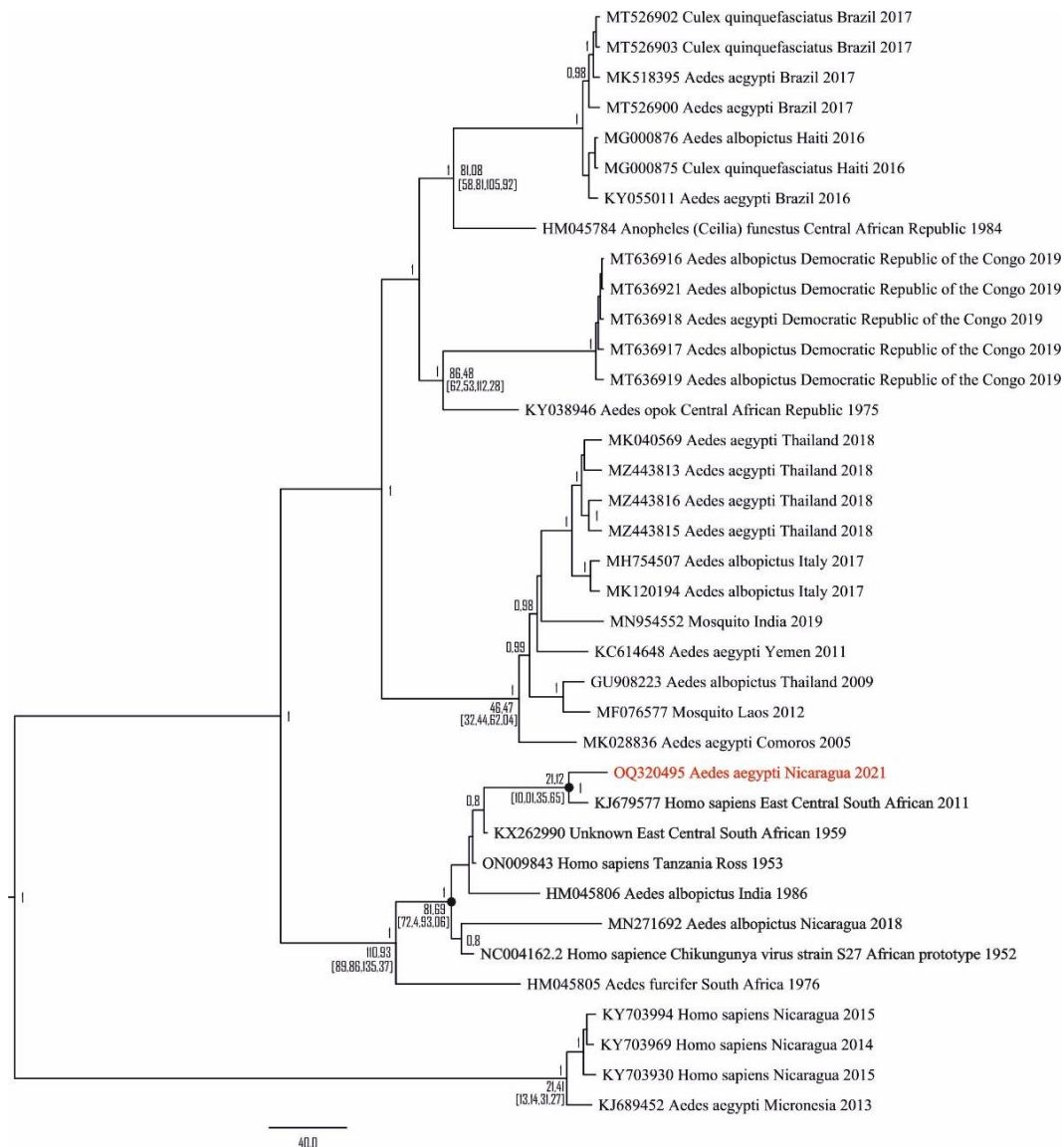


Fig. 2. Phylogenetic tree of CHIKV E2, 6K, E1 genome fragments.

The nodes of the tree indicate the posterior probability > 0.75 and the age of the group. The virus under study is highlighted. The scale shows the branch length representing years.

the common ancestor of these strains is estimated to have occurred 21 years ago (95% HPD 10–35). The isolate under study is also included in the cluster with prototype strains isolated in 1952–1986 in Tanzania and Africa.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Kraemer M.U.D., Sinka M.E., Duda K.A., et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* occurrence. *Sci. Data*. 2015;2:150035. DOI: <http://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>
- Ponce P., Morales D., Argoti A., Cevallos V.E. First report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), the Asian tiger mosquito, in Ecuador. *J. Med. Entomol.* 2018;55(1):248–9. DOI: <http://doi.org/10.1093/jme/tjx165>
- Hermanns K., Marklewitz M., Zirkel F., et al. Agua Salud alphavirus defines a novel lineage of insect-specific alphaviruses discovered in the New World. *J. Gen. Virol.* 2020;101(1):96–104. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001344>
- Guzman M.G., Halstead S.B., Artsob H., et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8(12 Suppl.):S7–16. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- Vega-Rua A., Zouache K., Caro V., et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit Chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*. 2013;8(3):e59716. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
- Lundstrom J.O., Hesson J.C., Schafer M.L., et al. Sindbis virus polyarthritis outbreak signalled by virus prevalence in the mosquito vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019;13(8):e0007702. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007702>
- Villero-Wolf Y., Mattar S., Puerta-González A., et al. Genomic epidemiology of Chikungunya virus in Colombia reveals genetic variability of strains and multiple geographic introductions in outbreak, 2014. *Sci. Rep.* 2019;9(1):9970. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45981-8>
- Cevallos V., Ponce P., Waggoner J.J., et al. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Acta Trop.* 2018;177:74–80. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.029>

9. Waggoner J.J., Gresh L., Vargas M.J., et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, Chikungunya virus, and Dengue virus. *Clin. Infect. Dis.* 2016;63(12):1584–90. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciw589>
10. da Costa C.F., da Silva A.V., do Nascimento V.A., et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(7):e0006594. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006594>
11. Eldadah Z.A., Asher D.M., Godec M.S., et al. Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 1991;33(4):260–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.1890330410>
12. Игнатъев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С. и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020;97(3):227–32. Ignatyev G.M., Kaa K.V., Oksanich A.S., et al. Indication and identification of dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. Mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2020;97(3):227–32. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4> EDN: <https://elibrary.ru/ufhtab>
13. Čabanová V., Tichá E., Bradbury R.S., et al. Mosquito surveillance of West Nile and Usutu viruses in four territorial units of Slovakia and description of a confirmed autochthonous human case of West Nile fever, 2018 to 2019. *Euro Surveill.* 2021;26(19):2000063. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.S.2021.26.19.2000063>
14. Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н. и др. Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа; авидность специфических антител, как инструмент дифференциальной диагностики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(2):215–24. Atrasheuskaya A.V., Kazakova E.V., Zhirenkina E.N., et al. The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua – virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2022;99(2):215–24. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196> EDN: <https://elibrary.ru/tyopaj>
15. Shurtleff A.C., Beasley D.W., Chen J.J., et al. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology.* 2001;281(1):75–87. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0748>

Information about the authors

Georgy M. Ignatyev — D. Sci. (Med.), Professor, main expert, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Alexey S. Oksanich[✉] — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, oksanich@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Elena V. Kazakova — Deputy director for HR and organizational design, St. Petersburg Research Institute for Vaccines and Sera, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Tatyana G. Samartseva — researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Elena V. Otrashkevskaya — leading employee, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Stanislav V. Uyba — General director, Mechnikov Latin American Institute of Biotechnology, Managua, Nicaragua, <https://orcid.org/0000-0001-9246-3915>

Victor P. Trukhin — Director, St. Petersburg Research Institute for Vaccines and Sera, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Author contribution: *Ignatyev G.M.* — substantial contribution to the study design; direct participation in the laboratory investigation; editing; *Oksanich A.S.* — design and direct performance of molecular-biological experiments; editing; critical analysis of the text content; *Kazakova E.V.* — collection and processing of material; *Samartseva T.G.* — direct participation in the experimental work; *Otrashkevskaya E.V.* — analysis and interpretation of the study results; statistical analysis; *Uyba S.V.* — design and organization of material collection; *Trukhin V.P.* — analysis of results. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, 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 14.07.2023;
accepted for publication 10.09.2023;
published 28.10.2023

Информация об авторах

Игнатъев Георгий Михайлович — д.м.н., профессор, главный сотрудник лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Оксанич Алексей Сергеевич[✉] — к.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, oksanich@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Казакова Елена Владимировна — зам. директора по управлению персоналом и организационному проектированию Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0218-6641>

Самарцева Татьяна Геннадьевна — н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Отрашевская Елена Викторовна — ведущий сотрудник лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Уйба Станислав Валентинович — генеральный директор Латиноамериканского института биотехнологий «Мечников», Манagua, Республика Никарагуа, <https://orcid.org/0000-0001-9246-3915>

Трухин Виктор Павлович — директор Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Участие авторов: *Игнатъев Г.М.* — разработка дизайна исследований; непосредственное участие в выполнении работ; написание статьи; *Оксанич А.С.* — дизайн, разработка и проведение молекулярно-биологических исследований, написание статьи, критический анализ текста; *Казакова Е.В.* — сбор и обработка материала; *Самарцева Т.Г.* — участие в экспериментальных исследованиях; *Отрашевская Е.В.* — анализ и интерпретация результатов исследований; статистическая обработка; *Уйба С.В.* — дизайн и организация сбора материала; *Трухин В.П.* — анализ результатов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 14.07.2023;
принята к публикации 10.09.2023;
опубликована 28.10.2023



Сравнительный анализ уровня IgG в сыворотках крови больных COVID-19, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», и здоровых доноров до пандемии

Тараканова Ю.Н.[✉], Борисова О.В., Дмитриев Д.А., Личутина М.В., Массино Ю.С., Печелюлько А.А., Сегал О.Л., Яковлева Д.А., Дмитриев А.Д.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Измерение концентрации сывороточного иммуноглобулина G (IgG) используется в диагностике и мониторинге многих заболеваний. Поэтому важно изучить влияние пандемии COVID-19 на уровень IgG в популяции.

Целью работы был сравнительный анализ среднего уровня сывороточного IgG в образцах крови, полученных от госпитализированных пациентов с COVID-19 ($n = 31$), здоровых доноров до начала пандемии ($n = 30$) и доноров, вакцинированных препаратом «Спутник V» (не болевших COVID-19; $n = 34$).

Материалы и методы. IgG измеряли двумя методами твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА): зарегистрированной российской системой «IgG общий-ИФА-БЕСТ» и сконструированным в лаборатории конкурентным ИФА, основанным на моноклональных биспецифических антителах к IgG человека и пероксидазе хрена.

Результаты и обсуждение. Отличий в среднем уровне сывороточного IgG в трёх группах не обнаружили (независимо от пола); оба метода дали соотносимые результаты. Однако система «IgG общий-ИФА-БЕСТ» выявила статистически значимые различия в концентрации сывороточного IgG в подгруппах пациентов-мужчин с разным уровнем антител к вирусному антигену к рецепторсвязывающему домену (receptor-binding domain, RBD): ниже и выше 400 ВАУ/мл. У 10 мужчин с RBD-антигеном < 400 ВАУ/мл содержание IgG было $14,3 \pm 4,1$ мг/мл, у 6 мужчин с RBD-антигеном > 400 ВАУ/мл — $6,9 \pm 2,7$ мг/мл.

Закключение. Средний уровень IgG в сыворотках крови, полученных до пандемии, не отличался от такового у здоровых доноров, вакцинированных препаратом «Спутник V», или пациентов, госпитализированных в связи с COVID-19. При этом обнаружено сравнительное снижение средней концентрации IgG у пациентов-мужчин с COVID-19 и уровнем анти-RBD антител > 400 ВАУ/мл. В учётом данных литературы об ассоциации снижения сывороточного IgG с тяжестью COVID-19 целесообразно сравнить выборки большего размера.

Ключевые слова: биспецифические антитела, IgG человека, COVID-19, SARS-CoV-2, антитела к RBD, иммуноглобулин G

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (протокол № 12 от 04.10.2023).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования. Работа выполнена с использованием научного оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова — при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021).

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

Для цитирования: Тараканова Ю.Н., Борисова О.В., Дмитриев Д.А., Личутина М.В., Массино Ю.С., Печелюлько А.А., Сегал О.Л., Яковлева Д.А., Дмитриев А.Д. Сравнительный анализ уровня IgG в сыворотках крови больных COVID-19, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», и здоровых доноров до пандемии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):319–327.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-367>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-367>

Comparative analysis of IgG levels in blood sera from patients with COVID-19, persons vaccinated by «Gam-COVID-Vac» and healthy donors before the pandemic

Yulia N. Tarakanova[✉], Olga V. Borisova, Dmitriy A. Dmitriev, Maria V. Lichutina, Yulia S. Massino, Anastasia A. Pechelyulko, Olga L. Segal, Dinora A. Yakovleva, Alexander D. Dmitriev

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Serum IgG measurement is used in the diagnosis and monitoring of many diseases. Therefore, it seems important to study the impact of coronavirus pandemic on IgG levels in population and the role of this parameter in COVID-19.

The **aim** of this study was to compare mean IgG levels in sera obtained from 31 hospitalized COVID-19 patients, 30 healthy donors before pandemic and 34 donors vaccinated with «Sputnik V» (have not had COVID-19).

Materials and methods. Total IgG was quantitated by two enzyme immunoassays (EIAs): «IgG Total-ELISA-BEST» kit certificated in Russia and homemade competitive EIA utilizing bispecific monoclonal antibodies (bsAbs) against human IgG (HlgG) and horseradish peroxidase (HRP).

Results and discussion. The groups did not show differences in IgG levels (regardless of sex) with both methods giving comparable results. However, «IgG Total-ELISA-BEST» kit revealed statistically significant differences in mean serum IgG levels in subgroups of male patients depending on the levels of antibodies to viral RBD-antigen: below and above 400 BAU/ml. In the first subgroup (10 men) the mean serum IgG content was 14.3 ± 4.1 mg/mL, while in the second (6 men) — 6.9 ± 2.7 mg/mL.

Conclusion. Sera obtained before pandemic contained the same mean IgG concentrations as sera from donors vaccinated with «Sputnik V» and COVID-19 patients. The relatively decreased mean IgG concentration was found only in COVID-19 male patients with anti-RBD antibodies levels above 400 BAU/ml. In light of literature data on association of decreased serum IgG with COVID-19 severity, it would be reasonable to further compare larger groups, taking into account clinical differences. The possibility of using bsAbs for human Ig measurements by competitive EIA was demonstrated.

Keywords: COVID 19, SARS-CoV-2, anti RBD antibodies, IgG, immunoglobulin G, bispecific antibodies, enzyme immunoassay.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 12, October 4, 2023).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding. The study was carried out on the scientific equipment of the Collective Usage Center «I.I. Mechnikov NIIVS», Moscow, Russia, with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Science of Russia, Agreement No. 075-15-2021-676 dated 28.07.2021.

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

For citation: Tarakanova Yu.N., Borisova O.V., Dmitriev D.A., Lichutina M.V., Massino Yu.S., Pechelyulko A.A., Segal O.L., Yakovleva D.A., Dmitriev A.D. Comparative analysis of IgG levels in blood sera from patients with COVID-19, persons vaccinated by «Gam-COVID-Vac» and healthy donors before the pandemic. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):319–327.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-367>

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

Введение

Иммуноглобулин G (IgG) является доминирующим классом антител у млекопитающих, составляя около 75% общего количества этих белков в сыворотке крови. У человека обнаружены 4 подкласса IgG, отличающиеся строением тяжёлых цепей. IgG играет важную роль в гуморальном иммунитете, выполняя разнообразные биологические

функции: опсонизация микробов для их поглощения фагоцитами; антибактериальная защита через комплементзависимый лизис микробных клеток и разрушение их токсинов; индукция антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности; обеспечение иммунитета новорождённых (материнский IgG транспортируется через плаценту в кровотоки плода); ингибирование В-клеток по типу

обратной связи при завершении гуморального иммунного ответа.

Измерение иммуноглобулинов, включая IgG, используется в диагностике и мониторинге многих заболеваний, включая иммунодефициты и аутоиммунные болезни. Вместе с тем популяционный уровень IgG подвержен влиянию разных факторов. В ряде работ изучали влияние таких переменных, как пол, возраст, этническая принадлежность, географическое расположение района или страны (возможны различия, обусловленные экологическими факторами), некоторые особенности образа жизни и привычек (например, распространённость курения, потребления алкоголя и др.), на уровень IgG в соответствующих популяциях. При этом в разных исследованиях получены неоднозначные результаты. В недавнем метаобзоре была сделана попытка систематизировать данные этих исследований [1]. В частности, получено подтверждение влияния на уровень IgG курения, употребления алкоголя, приёма кортикостероидов, гипертонии и психологического стресса [1].

На протяжении последних 3 лет население всего мира, включая Россию, подвергалось влиянию неблагоприятных факторов, связанных с пандемией коронавируса SARS-CoV-2. Причём наряду с прямым патогенным действием вируса, на людей оказывали влияние и многочисленные стрессовые ситуации, сопряжённые с пандемией (вынужденная изоляция, потеря работы, страх за жизнь и здоровье близких, переутомление у медицинских работников и др.). По данным ВОЗ, в совокупности влияние указанных факторов привело к повышению распространённости тревожных расстройств и депрессии в мире на 25%¹.

В этой связи встаёт вопрос: как это могло отразиться на уровне IgG в популяциях конкретных стран? Важно также выяснить биологическое и клиническое значение такого параметра, как количество IgG в сыворотке крови, при COVID-19. Обнаруженные различия в тяжести протекания болезни (от бессимптомного до летального) и наличие постковидного синдрома побудили исследователей к поиску иммунологических маркеров, которые могли бы иметь прогностическое значение при COVID-19. Закономерно, что наряду с другими факторами обратили внимание и на такой параметр, как уровень IgG в сыворотке крови. Ранее была показана ассоциация дефицита IgG с рядом других лёгочных заболеваний [2], что создало предпосылки для предположений о наличии подобных связей и при

COVID-19. Действительно, в недавних исследованиях, независимо проведённых в нескольких странах (Германии, Турции, Греции, Иране, России), были получены результаты, указывающие на ассоциацию между сниженным уровнем IgG в сыворотке крови и тяжёлым течением COVID-19 [3–7]. Высказано предположение, что этот показатель может иметь важное прогностическое значение для оценки риска тяжёлого течения болезни и летального исхода [3–6]. Какие конкретные изменения и нарушения в функционировании системы В-клеточного иммунитета и метаболизма IgG стоят за наблюдаемыми эффектами, остаётся неясным.

Целью настоящей работы было изучение уровня IgG в сыворотках крови, полученных от пациентов, госпитализированных по поводу COVID-19, и в двух разных группах сравнения, одна из которых включала здоровых доноров до начала пандемии, а вторая — доноров, прошедших полный курс вакцинации «Спутником V» и не болевших COVID-19.

Материалы и методы

Исследование проводили на 95 образцах двумя независимыми методами иммуноферментного анализа (ИФА).

В первом методе использовали зарегистрированный диагностический набор (устроенный по принципу сэндвич-метода) «IgG общий-ИФА-БЕСТ». Второй метод предполагал испытание сконструированного в лаборатории варианта конкурентного ИФА, в котором для определения IgG человека (HIgG) использовали полученные нами ранее [8–10] моноклональные антитела (МКА) с двойной специфичностью к HIgG и ферменту пероксидаза хрена (horseradish peroxidase, HRP). Считается, что биспецифические антитела (БИАТ) могут иметь ряд преимуществ перед обычными МКА при применении в ИФА и иммуногистохимии [11]. Например, БИАТ освобождают от необходимости использовать детектирующие (меченые) антитела, конъюгированные с HRP или другими ферментами, что может давать меньший фон [11]. Ранее мы показали эффективность указанных БИАТ для выявления специфических антител в твердофазном ИФА на примере определения антител к вирусу иммунодефицита человека [10], а в настоящей работе была испытана возможность использования этих реагентов в формате конкурентного ИФА.

Материалы и реактивы

В работе использовали разборные 96-луночные планшеты из полистирола «MaxiSorp» («Nunc»), BrCN-сефарозу («Farmacia»), раствор тетраметилбензидина (ТМБ) («Диагностические системы»), диагностический набор «IgG общий-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест»), IgG из сыворотки крови человека («Sigma-Aldrich»), HRP и прочие реактивы («Sigma»).

¹ ВОЗ. На фоне пандемии COVID-19 во всём мире распространённость тревожных расстройств и депрессии выросла на 25%. 02.03.2022. <https://www.who.int/ru/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide>

Образцы сывороток крови

Сыворотки здоровых доноров и пациентов, госпитализированных с COVID-19 (с известной концентрацией вирусспецифических антител (IgG) к рецепторсвязывающему домену (receptor-binding domain, RBD) S-белка SARS-CoV-2, определённой с помощью тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G-количественный»), были предоставлены из коллекции НПО «Диагностические системы». Все обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (протокол № 12 от 04.10.2023).

Получение моноклональных БИАТ

В работе использовали полученные нами ранее мышинные моноклональные БИАТ 75/36 (БИАТ 75/36), способные одновременно связываться с двумя антигенами: HRP и HlgG. БИАТ 75/36 являются продуктами гибридной гибридомы (тетрадомы), образованной путём слияния двух родительских клеточных линий: гибридомы, продуцирующей анти-HRP МКА 36F9, и гибридомы, секретирующей анти-HlgG МКА 75G5. Конструирование указанной тетрадомы описано нами ранее [9–11]. БИАТ 75/36 относились к подклассу IgG1 мыши, как и оба родительских МКА.

Очистка антител

БИАТ 75/36 выделяли из асцитов, полученных после инокуляции мышей тетрадомными клетками. Поскольку клетки тетрадомы продуцируют 3 вида иммунологически активных антител (анти-HlgG, анти-HRP и БИАТ), образованных в результате комбинации лёгких и тяжёлых цепей родительских МКА, для очистки БИАТ использовали две последовательные аффинные хроматографии: на HlgG-сефарозе и HRP-сефарозе [8–10]. Чистоту препарата БИАТ контролировали с помощью SDS-электрофореза в 12,5% акриламидном геле [12].

Определение антигенсвязывающей активности моноклональных БИАТ

Способность аффинно-очищенных БИАТ одновременно связывать два антигена подтверждали с помощью ИФА [8]. Для этого поверхность 96-луночных полистироловых планшетов насыщали HlgG и инкубировали с разведениями БИАТ в присутствии HRP. Иммунные комплексы выявляли с помощью ТМБ.

Определение концентрации белков

Концентрацию белка определяли по методу Лоури с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Стандарт готовили исходя из того, что для 1% раствора альбу-

мина $A_{280\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 7,6$ [13]. Концентрацию очищенных белков определяли, полагая, что для 1% раствора мышинных антител $A_{280\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 14$ [13]; для 1% раствора очищенной пероксидазы $A_{403\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 22,75$ и $A_{280\text{ нм}}^{1\text{ см}} = 7,3$ [12].

Определение HlgG в сыворотке крови

Содержание HlgG в сыворотке крови определяли двумя методами. В первом использовали набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации IgG в сыворотке крови «IgG общий-ИФА-БЕСТ». Метод основан на двустадийном «сэндвич»-варианте ИФА с применением МКА к HlgG.

Кроме того, в тех же сыворотках содержание HlgG определяли с помощью разработанного нами конкурентного метода, основанного на использовании БИАТ к HlgG и HRP.

Лунки полистироловых планшетов насыщали раствором HlgG (по 100 мкл на лунку) в 50 мМ Na-карбонатном буфере pH 9,5 в течение ночи при комнатной температуре. После насыщения антигеном лунки несколько раз отмывали 25 мМ Na-фосфатным буфером pH 7,5, содержащим 150 мМ NaCl, 0,05% Твина-20. Затем в каждую лунку вносили по 20 мкл сыворотки человека, предварительно разведённой в 1000 раз в 25 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,5, содержащем 15 мМ NaCl, 0,05% Твина-20 и 0,2% бычьего сывороточного альбумина (ИФА-буфер), а также 100 мкл раствора, содержащего 600 нг/мл БИАТ и 2 мкг/мл HRP в указанном ИФА-буфере. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C, отмывали и окрашивали раствором ТМБ в течение 15 мин при комнатной температуре, реакцию останавливали 1 М раствором H₂SO₄ (50 мкл на лунку). Оптическую плотность определяли с помощью спектрофотометра при 450 нм. Концентрацию IgG рассчитывали с помощью калибровочной кривой, для построения которой использовали стандарты HlgG в концентрациях 0; 1,4; 2,8; 6; 12; 24 мг/мл.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica for Windows 12.0». Количественные переменные представляли в виде среднего арифметического (\bar{X}) со среднеквадратическим отклонением (SD). Полученные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения (W-критерий Шапиро–Уилка). Значимость различий между группами определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни для независимых групп. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Корреляцию рассчитывали по методу Пирсона.

Результаты

В настоящее исследование были включены 30 здоровых доноров крови (образцы крови были

получены до пандемии; 1-я группа), 34 здоровых донора, вакцинированных препаратом «Спутник V» (не болевших COVID-19; 2-я группа), и 31 пациент, имевший выписку с установленным клиническим диагнозом COVID-19 и подтверждением диагноза методом ПЦР (пациенты были госпитализированы в период с марта по ноябрь 2021 г., с преобладанием геноварианта Delta вируса SARS-CoV-2; 3-я группа). Возраст здоровых доноров и пациентов варьировал от 18 до 85 лет. Процедуру измерения IgG в сыворотке крови с помощью диагностического набора «IgG общий-ИФА-БЕСТ» проводили согласно инструкции производителя. Кроме того, в тех же сыворотках содержание IgG определяли с помощью разработанного нами конкурентного метода, основанного на использовании БИАТ 75/36, специфичных к hIgG и HRP. БИАТ, представляющие собой один из продуктов секреции гибридной гибридомы (тетрадомы), ранее были нами детально охарактеризованы в отношении их антигенсвязывающих свойств с помощью ИФА, радиоиммунного анализа и биосенсора [8, 9].

БИАТ 75/36 обладают высокой аффинностью по отношению к обоим антигенам: равновесная константа ассоциации (K_a) для связывания БИАТ с иммобилизованным на твердой фазе hIgG составила $\sim 2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [9], а с HRP в растворе $\sim 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [15]. Специфичность БИАТ (отсутствие реакции с другими классами иммуноглобулинов) была подтверждена с помощью ИФА. Для этого поверхность 96-луночных полистироловых планшетов насыщали иммуноглобулинами человека классов А, М, Е и G и инкубировали с разведениями БИАТ в присутствии HRP. Иммунные комплексы выявляли с помощью ТМБ. В результате иммунные комплексы образовались только в лунках с иммобилизованным hIgG, а с IgA, IgM и IgE человека БИАТ 75/36 не реагировали (данные не представлены). При использовании конкурентного метода в качестве от-

Таблица 1. Концентрация IgG в сыворотке крови госпитализированных с COVID-19 пациентов и в группах сравнения, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Table 1. The mean concentrations of serum IgG in COVID-19 patients and in control groups, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Группа Group	IgG, мг/мл mg/ml	
	«IgG общий-ИФА-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs based EIA
1 (n = 30)	10,1 ± 6,6	10,4 ± 3,3
2 (n = 31)	11,5 ± 6,8	10,8 ± 5,8
3 (n = 34)	11,7 ± 5,6	9,8 ± 4,2

Примечание. Все сыворотки пациентов содержали вирусспецифические анти-RBD-антитела.

Note. All patient sera contained virus-specific anti-RBD antibodies.

рицательного контроля использовали вытеснение IgA, IgM и IgE. В качестве положительного контроля служили измерения, полученные с помощью тест-системы «IgG общий-ИФА-БЕСТ».

В табл. 1 представлены результаты определения уровня IgG двумя описанными выше методами в образцах сывороток доноров 3 групп (у больных кровь была взята не ранее 10 дней и не позднее 30 дней после постановки диагноза). Статистически достоверных различий между группами не выявлено. Корреляционная связь с результатами, полученными с помощью конкурентного ИФА, использующего БИАТ, была определена как средняя ($r = 0,52$). При этом концентрация IgG в образцах сыворотки крови пациентов и доноров из групп сравнения варьировала в широком диапазоне: приблизительно от 2,5 до 20 мг/мл (данные не приведены). Дальнейшее разделение здоровых доноров и пациентов на три возрастные группы (18–44, 45–64, 65 лет и старше) также не выявило статистически достоверных различий в концентрации IgG.

Разделение образцов сыворотки на группы в зависимости от пола здоровых доноров и пациен-

Таблица 2. Концентрация IgG в сыворотке крови госпитализированных с COVID-19 пациентов и в группах сравнения при разделении по полу, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Table 2. The mean concentrations of serum IgG in COVID-19 patients and in control groups depending on sex, $\bar{X} \pm \text{SD}$

Группа Group	Пол Sex	n	IgG, мг/мл mg/ml	
			«IgG общий-ИФА-Вектор-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs-based EIA
1	Мужчины Men	16	11,3 ± 5,2	10,8 ± 2,2
	Женщины Women	14	8,8 ± 4,2	9,8 ± 2,7
2	Мужчины Men	16	11,2 ± 4,4	10,2 ± 2,9
	Женщины Women	15	8,7 ± 3,6	8,3 ± 4,4
3	Мужчины Men	13	10,0 ± 3,2	8,8 ± 3,5
	Женщины Women	21	11,8 ± 3,5	10,4 ± 2,5

Примечание. Все сыворотки пациентов содержали вирусспецифические анти-RBD-антитела.

Note. All patient sera contained virus-specific anti-RBD antibodies.

тов (табл. 2) не выявило различий в среднем уровне IgG между группами. Уровень IgG у вакцинированных доноров не зависел и от времени, прошедшего от момента вакцинации до забора крови, в исследованный период от 1 до 2 мес (табл. 3).

Пациентов (3-я группа) дополнительно разделили на две подгруппы в зависимости от уровня специфических антител к RBD-антигену SARS-CoV-2. В одну подгруппу отнесли пациентов с уровнем анти-RBD-антител < 400 BAU/мл (значения варьировали у разных пациентов от 18 до 365 BAU/мл, возраст 27–85 лет), а в другую — с уровнем анти-RBD > 400 BAU/мл (возраст 36–70 лет). Кроме того, каждую группу делили по полу. Обнаружено, что в подгруппе из 10 пациентов-мужчин (средний возраст 59,5 года), имевших более низкий уровень специфических антител к RBD-антигену, концентрация IgG при измерении системой «IgG общий-ИФА-БЕСТ» в среднем составляла $14,3 \pm 4,1$ мг/мл, тогда как у 6 мужчин (средний возраст 54 года) с уровнем анти-RBD-антител > 400 BAU/мл концентрация IgG составляла в среднем всего $6,9 \pm 2,7$ мг/мл (табл. 4). Эти различия были статистически значимы. Достоверных различий у пациентов-женщин, разделённых на подгруппы по этому показателю, не выявлено. Сходная тенденция наблюдалась и при измерениях в тех же подгруп-

пах с помощью конкурентного ИФА: среднее значение концентрации IgG для пациентов-мужчин с уровнем анти-RBD-антител > 400 BAU составляло $6,9 \pm 3,4$ мг/мл, в то время как у мужчин с меньшим уровнем специфических антител — $11,2 \pm 3,9$ мг/мл (табл. 4), однако наблюдаемые различия между группами пациентов-мужчин в этом случае не достигли статистически значимого уровня.

Обсуждение

Результаты проведённых нами измерений показали, что средний уровень IgG в сыворотках крови доноров (1-я и 2-я группы) и пациентов (3-я группа) не различался. Отсутствие различий сохранялось и при разделении выборок на подгруппы по возрасту, полу и времени, прошедшему от начала вакцинации (для здоровых доноров) и взятия крови. Однако статистически значимое снижение среднего значения количества IgG в сыворотке крови обнаружили (при измерении тест-системой «IgG общий-ИФА-БЕСТ») в небольшой группе, которую составляли мужчины, болевшие COVID-19 и имевшие высокий уровень специфических антител к вирусному RBD-антигену в крови (> 400 BAU/мл). Средний уровень IgG в этой группе был примерно в 2 раза ниже такового у пациентов-мужчин с меньшим уровнем анти-RBD-антител. Можно предполо-

Таблица 3. Концентрация IgG в сыворотке крови доноров в разные сроки после вакцинации препаратом «Спутник V», $\bar{X} \pm SD$

Table 3. The mean concentrations of serum IgG in vaccinated donors, which gave blood at different time points after the last immunization with «Sputnik V», $\bar{X} \pm SD$

Время забора крови после вакцинации Time from vaccination to blood donation	n	IgG, мг/мл mg/ml	
		«IgG общий-ИФА-Вектор-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs-based EIA
В течение 1 мес Within first month	6	$9,3 \pm 3,7$	$8,1 \pm 5,6$
Через 1 мес 1 month after	19	$11,7 \pm 4,8$	$10,5 \pm 3,4$
Через 2 мес 2 months after	9	$10,3 \pm 5,8$	$9,2 \pm 4,7$

Таблица 4. Концентрация IgG в сыворотке крови госпитализированных с COVID-19 пациентов с различным уровнем антител к RBD-антигену SARS-CoV-2, $\bar{X} \pm SD$

Table 4. The mean concentrations of serum IgG in hospitalized COVID-19 patients with different levels of anti-RBD antigen antibodies, depending on sex, $\bar{X} \pm SD$

Уровень анти-RBD-антител в сыворотке крови пациентов, BAU/мл Anti-RBD Abs serum level in hospitalized COVID-19 patients, BAU/ml	Пол Sex	n	IgG, мг/мл mg/ml	
			«IgG общий-ИФА-Вектор-БЕСТ» «IgG Total-ELISA-BEST»	конкурентный ИФА (БИАТ) bsAbs-based EIA
18–350 (< 400)	Мужчины Men	10	$14,3 \pm 4,1$	$11,2 \pm 3,9$
	Женщины Women	11	$8,4 \pm 3,7$	$8,1 \pm 3,4$
	Всего Total	21	$11,2 \pm 4,8$	$9,6 \pm 3,9$
≥ 400	Мужчины Men	6	$6,9 \pm 2,7$	$6,9 \pm 3,4$
	Женщины Women	4	$9,4 \pm 3,8$	$8,8 \pm 2,3$
	Всего Total	10	$7,9 \pm 3,2$	$7,7 \pm 3,1$

жить, что высокий уровень антивирусных антител у мужчин данной подгруппы обеспечивался специфическим клоном (или клонами) В-лимфоцитов, несмотря на сопутствующее снижение общего уровня IgG.

В связи с имеющимися данными о возможном прогностическом значении понижения уровня IgG в отношении более тяжёлого протекания COVID-19 [3–6, 16] это наблюдение (имеющее сейчас только предварительный характер в силу маленьких размеров выборок) заслуживает, на наш взгляд, дальнейшего исследования на большем числе пациентов и при сопоставлении с клиническими данными. В частности, из-за их отсутствия невозможно судить о том, насколько выявленная нами подгруппа пациентов-мужчин с высоким уровнем антител к вирусному RBD-антигену и пониженным уровнем IgG соответствует по своим клиническим особенностям группам со сниженным уровнем IgG, описанным в работах других авторов, где проводили сравнение пациентов с разной тяжестью COVID-19 (причём без дифференциации по тяжести заболевания по клиническим критериям, только при общем сравнении IgG у «больных» и «здоровых», различия не выявлялись, как и в нашей работе) [3, 7]. Опираясь на данные литературы, можно только отметить, что при тяжёлом течении COVID-19 часто наблюдаются высокий уровень антител к вирусным антигенам [17] и лимфоцитопения со снижением числа CD4⁺-Т-хелперов, цитотоксических CD8⁺-Т-клеток и естественных киллеров [7, 18]. В отношении В-клеток картина сложнее: с одной стороны, сообщалось об уменьшении количества В-клеток при тяжёлом течении COVID-19 [3, 4, 18], в том числе при одновременном снижении уровня IgG [3, 4]. Однако в другом исследовании таких изменений в количестве В-клеток не регистрировали, несмотря на снижение уровня IgG и IgM (по сравнению с группами пациентов с заболеванием лёгкой и средней тяжести и контрольной группой) [7]; а в некоторых работах, наоборот, обнаруживали некоторое возрастание количества В-лимфоцитов при тяжёлом течении заболевания [19]. Важно, что при тяжёлом протекании COVID-19 неоднократно обнаруживали изменения состава популяции В-лимфоцитов с возрастанием числа аномальных В-клеток памяти и плазмочитов, образованных в результате дифференцировки по экстрафолликулярному пути [17, 20, 21]. Предполагается, что аномальные В-клетки, В-клеточные рецепторы которых не подвергались гипермутагенезу и селекции на аффинность в фолликулярных зародышевых центрах, могут быть источником антител с уменьшенной аффинностью к вирусным антигенам и с пониженной нейтрализующей способностью, обуславливая более тяжёлое протекание болезни; кроме того, они могут усиливать процессы воспаления [17, 20, 21].

Следует также добавить, что мы не обнаружи-

ли аналогичного снижения уровня IgG в подгруппе женщин с высоким (> 400 ВАУ/мл) уровнем антивирусных антител. Небольшие размеры выборок, как и отсутствие у нас дополнительных клинических данных, не позволяет делать предположений о причинах указанных различий по полу, хотя в ряде исследований показано, что у мужчин чаще, чем у женщин, наблюдается тяжёлое течение COVID-19, причём для них характерен и более высокий уровень антител к коронавирусным антигенам, по-видимому сопряжённый с нарушением регуляции иммунного ответа со сдвигом в сторону экстрафолликулярной (т.е. вне зародышевых центров) дифференцировки В-клеток [21]. Важное значение может иметь и анализ изменений уровня разных подтипов IgG и других классов иммуноглобулинов при COVID-19. Так, наблюдали определённые корреляции между изменениями в соотношениях некоторых подклассов IgG и характером протекания COVID-19 [16, 22, 23]. Например, обнаружена связь между увеличением уровня IgG3 (при отсутствии изменения суммарного содержания всех подклассов сывороточного IgG) и повышенным риском развития постковидного синдрома [23]. Показана корреляция между тяжёлым протеканием COVID-19, пониженным уровнем IgG2 и лимфоцитопенией [22]. Предполагается, что из-за нарушения регуляции продукции цитокинов переключение классов антител при COVID-19 может происходить с преимущественным образованием IgG1 и IgG3 при дефиците IgG2 [22]. В некоторых работах наблюдали связь между пониженным уровнем сывороточного IgA и более тяжёлым протеканием болезни [6], в то время как по другим наблюдениям, наоборот, тяжёлое течение COVID-19 сопровождалось повышением уровня IgA [24]. Вместе с тем в недавно проведённом исследовании не было получено подтверждения, что уровни IgG и IgA могут служить прогностическими критериями в отношении неблагоприятного протекания COVID-19 [25]. Однако авторы указанной работы, как и другие исследователи [3, 17], подчёркивают, что на результаты могут влиять различия в изученных выборках, в частности, особенности терапии больных (например, назначение кортикостероидных препаратов, способных снижать число лимфоцитов и уровень иммуноглобулинов, и др.).

В настоящей работе уровень IgG в образцах сыворотки крови человека измеряли с помощью двух различных методов твёрдофазного ИФА: «IgG общий-ИФА-БЕСТ» (устроен по принципу сэндвич-метода) и внутрилабораторной тест-системой на основе БИАТ. Оба метода дали в целом сопоставимые результаты, хотя, например, различия в среднем уровне сывороточного IgG между группами пациентов-мужчин с меньшим и большим уровнями анти-RBD-антител достигали статистической значимости только при измерении с помощью систе-

мы «IgG общий-ИФА-БЕСТ» (табл. 4). Ранее нами было показано, что БИАТ 75/36 с двойной специфичностью к НIgG и HRP можно использовать в твёрдофазном неконкурентном ИФА для определения специфических антител к вирусу иммунодефицита человека [10]. Полученные в настоящей работе данные показывают, что БИАТ 75/36 можно также применять для определения НIgG в формате конкурентного твердофазного ИФА. При этом, в отличие от сэндвич-метода, описанный конкурентный метод позволяет проводить измерение IgG в сыворотке крови с использованием всего одного антитела (БИАТ 75/36) и без применения конъюгатов вторых (детектирующих) антител с HRP.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Khan S.R., van der Burgh A.C., Peeters R.P., et al. Determinants of serum immunoglobulin levels: a systematic review and meta-analysis. *Front. Immunol.* 2021;12:664526. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664526>
- Чучалин А.Г. Болезни, ассоциированные с иммуноглобулином G. *Терапевтический архив.* 2018;90(3):4–9. Chuchalin A.G. Disease associated with immunoglobulin G. *Therapeutic Archive.* 2018;90(3):4–9. DOI: <https://doi.org/10.26442/terarkh20189034-9> EDN: <https://elibrary.ru/ytpvaq>
- Husain-Syed F., Vadász I., Wilhelm J., et al. Immunoglobulin deficiency as an indicator of disease severity in patients with COVID-19. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2021;320(4):L590–9. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00359.2020>
- Çölkesen F., Kepenek K.E., Vatansav H., et al. Memory B cells and serum immunoglobulins are associated with disease severity and mortality in patients with COVID-19. *Postgrad. Med. J.* 2022;98(1164):765–71. DOI: <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140540>
- Vrettou C.S., Vassiliou A.G., Kakkas I., et al. Low admission immunoglobulin G levels predict poor outcome in patients with mild-to-critical COVID-19: A prospective, single-center study. *J. Epidemiol. Glob. Health.* 2021;11(4):338–43. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44197-021-00002-8>
- Barzegar-Amini M., Mahmoudi M., Dadgarmoghaddam M., et al. Comparison of serum total IgA levels in severe and mild COVID-19 patients and control group. *J. Clin. Immunol.* 2022;42(1):10–8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01149-6>
- Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.В. и др. Иммунологические особенности пациентов с COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания. *Проблемы медицинской микологии.* 2021;23(1):3–13. Frolova E.V., Filipova L.V., Uchevatkina A.V., et al. Immunological features of patients with COVID-19 depending on the severity of the disease. *Problems in Medical Mycology.* 2021;23(1):3–13. DOI: <https://doi.org/10.24412/1999-6780-2021-1-3-13> EDN: <https://elibrary.ru/jlyvvnq>
- Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L., et al. The comparison of the ability of monoclonal antibodies directed to different proteins (human IgG, human myoglobin and HRP) and bispecific antibodies derived thereof to bind antigens immobilized on a surface of a solid phase. *Clin. Chim. Acta.* 2001;309(1):57–71. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00531-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00531-9)
- Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L., et al. Analysis of the binding of bispecific monoclonal antibodies with immobilized antigens (human IgG and horseradish peroxidase) using a resonant mirror biosensor. *J. Immunol. Methods.* 2002;261(1-2):103–18. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00558-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00558-0)
- Массино Ю.С., Суханова Л.Л., Кизим Е.А. и др. Получение бифункциональных антител к IgG человека и пероксидазе хрена и их использование для тестирования антител к ВИЧ. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1994;117(3):291–3. Massino Y.S., Sukhanova L.L., Kizim E.A., et al. Production of bifunctional monoclonal antibodies to human IgG and horseradish peroxidase and their utilization for testing anti-HIV antibodies. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 1994;117(3): 294–6. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02444168>
- Parashar A., Sarkar S., Ganguly A., et al. Bispecific antibodies for diagnostic applications. In: Kontermann R., ed. *Bispecific Antibodies.* Berlin, Heidelberg;2011:349–67. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-20910-9_19
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Fasman G.D., ed. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Section A: Proteins. Volume 2.* Cleveland;1976:383.
- Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., et al. Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *J. Immunoassay.* 1983;4(3):209–327. DOI: <https://doi.org/10.1080/15321818308057011>
- Смирнова М.Б., Дергунова Н.Н., Кизим Е.А. и др. Изучение антигенсвязывающих свойств биспецифических моноклональных антител. *Биохимия.* 1997;62(1):51–9. Smirnova M.B., Dergunova N.N., Kizim E.A., et al. Study of antigen-binding properties of bispecific antibodies. *Biochemistry.* 1997;62(1):41–51.
- Wasiluk T., Sredzinska M., Rogowska A., et al. Analysis of the IgG subclass profile and IgG sum-total discrepancy in COVID-19 convalescent plasma donors: A single-centre prospective cohort study. *Transfus. Apher. Sci.* 2022;62(1):103527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2022.103527>
- Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., Astudillo M.G., et al. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell.* 2021;184(2):476–88.e11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.015>
- Lagadinou M., Zareifopoulos N., Gkentzi D., et al. Alterations in lymphocyte subsets and monocytes in patients diagnosed with SARS-CoV-2 pneumonia: a mini review of the literature. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2021;25(15):5057–62. DOI: https://doi.org/10.26355/eurrev_202108_26463
- Sosa-Hernández V.A., Torres-Ruiz J., Cervantes-Díaz R., et al. B cell subsets as severity-associated signatures in COVID-19 patients. *Front. Immunol.* 2020;11:611004. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611004>
- Wildner N.H., Ahmadi P., Schulte S., et al. B cell analysis in SARS-CoV-2 versus malaria: Increased frequencies of plasmablasts and atypical memory B cells in COVID-19. *J. Leukoc. Biol.* 2021;109(1):77–90. DOI: <https://doi.org/10.1002/JLB.5COVA0620-370RR>
- Søndergaard J.N., Tulyeu J., Edahiro R., et al. A sex-biased imbalance between Tfr, Tph, and atypical B cells determines antibody responses in COVID-19 patients. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2023;120(4):e2217902120. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2217902120>
- Taban E.M., Tintinger G.R., Joseph D., et al. Lymphopenia and IgG2 subclass deficiency in patients with severe COVID-19 pneumonia. *Afr. J. Thorac Crit. Care Med.* 2021;27(2):41–6. DOI: <https://doi.org/10.7196/AJTCCM.2021.v27i2.134>
- Cervia C., Zurbuchen Y., Taeschler P., et al. Immunoglobulin signature predicts risk of post-acute COVID-19 syndrome. *Nat.*

- Commun.* 2022;13(1):446.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27797-1>
24. Hasan A.O., Bomze D., Risch L., et al. Severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) is associated with elevated serum immunoglobulin (Ig) A and antiphospholipid IgA antibodies. *Clin. Infect. Dis.* 2021;73(9):e2869–74.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1496>

Информация об авторах

Тараканова Юлия Николаевна[✉] — к.б.н., зав. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, ytarakanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3226-5989>

Борисова Ольга Васильевна — к.х.н., зав. лаб. медицинской биотехнологии отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Дмитриев Дмитрий Александрович — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7397-6499>

Личутина Мария Владимировна — м.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9579-7865>

Массино Юлия Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1165-2712>

Печелюлько Анастасия Александровна — н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6628-1576>

Сегал Ольга Леонидовна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6621-236X>

Яковлева Динора Абдуллаевна — к.м.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>

Дмитриев Александр Дмитриевич — д.б.н., в.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1132-3708>

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 20.07.2023;
принята к публикации 11.10.2023;
опубликована 28.10.2023

25. Montrucchio G., Sales G., Balzani E., et al. Effectiveness of mid-regional pro-adrenomedullin, compared to other biomarkers (including lymphocyte subpopulations and immunoglobulins), as a prognostic biomarker in COVID-19 critically ill patients: New evidence from a 15-month observational prospective study. *Front. Med. (Lausanne)*. 2023;10:1122367.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1122367>

Information about the authors

Yulia N. Tarakanova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, ytarakanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3226-5989>

Olga V. Borisova — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of medical biotechnology, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

Dmitriy A. Dmitriev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7397-6499>

Maria V. Lichutina — junior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9579-7865>

Yulia S. Massino — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1165-2712>

Anastasia A. Pechelyulko — researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6628-1576>

Olga L. Segal — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6621-236X>

Dinora A. Yakovleva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>

Alexander D. Dmitriev — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1132-3708>

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 20.07.2023;
accepted for publication 11.10.2023;
published 28.10.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-376>

Monitoring of respiratory viral infections in Moscow during 2011–2022

Elizaveta N. Vetrova¹✉, Alyona I. Chernyshova¹, Tatiana N. Pritchina¹,
Elena I. Isaeva¹, Olga V. Morozova^{1,2}

¹National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia;

²Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Respiratory viruses (RV) circulate throughout the world and in all seasons of the year. Long-term monitoring of the distribution of respiratory pathogens is necessary to analyze the relevance of diagnostic systems to current viral isolates, to assess the risks of infection and the need for vaccine development and use, as well as to investigate the interdependence of RV reproduction in mixed infections.

Objective — to study the causative agents of acute respiratory viral infections (ARVI) in Moscow during 2011–2022 by reverse transcription with subsequent polymerase chain reaction with fluorescent hydrolysis probes detection in real-time (RT²-PCR).

Materials and Methods. Nasopharyngeal swabs from 3908 patients with acute respiratory infections were examined by the RT²-PCR.

Results. Monitoring of RV spread in Moscow showed cyclical changes in frequencies with three dominant species: influenza A virus (up to 31.3%), respiratory syncytial virus (up to 24.8%) and human rhinoviruses (up to 21.3%) in 2011–2020. The increase in the portion of unidentified clinical specimens from 1.2 to 28.5% in 2022 indicated incomplete accordance of diagnostic systems to modern RV isolates or the emergence of new species or strains of pathogens. Unidirectional changes in dynamics were registered for 5 out of 9 studied RV with correlation coefficients of 0.43–0.79. High frequencies of mixed acute respiratory viral infections (up to 33.4%) along with unidentified samples do not allow us to accurately assess the risks of infection with various RV in Moscow, but prove the necessity of preventing infectious diseases with the most common RV.

Conclusion. Analysis of the dynamics of RV frequencies in Moscow showed the preservation of the dominant species: influenza A virus, respiratory syncytial virus and human rhinoviruses. During the period of vaccination against COVID-19, the proportion of seasonal coronaviruses increased.

Keywords: *respiratory viruses, reverse transcription with real-time PCR, human respiratory syncytial virus (hRSv), human metapneumovirus (hMpv), human parainfluenza viruses types 1, 2, 3 and 4 (hPiv), human seasonal coronaviruses (hCov) and SARS-CoV-2, human rhinoviruses (hRv), human adenoviruses of groups B, C and E (hAdv), human bocavirus (hBov), influenza A (INF-A) and B (INF-B) viruses*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. Ethical approval from the Ethics Committee of the National Research Center of Epidemiology and Microbiology of N.F. Gamaleya of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia was taken before starting the research (Approval Code # 18 2022-02-21).

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: Vetrova E.N., Chernyshova A.I., Pritchina T.N., Isaeva E.I., Morozova O.V. Monitoring of respiratory viral infections in Moscow during 2011–2022. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2023;100(5):328–337.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-376>

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

Мониторинг респираторных вирусных инфекций в 2011–2022 годах в Москве

Ветрова Е.Н.¹, Чернышова А.И.¹, Притчина Т.Н.¹, Исаева Е.И.¹, Морозова О.В.^{1,2}

¹Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Респираторные вирусы (РВ) циркулируют повсеместно и круглогодично. Долговременный мониторинг распространения возбудителей респираторных инфекций необходим для анализа соответствия диагностических систем современным вирусным изолятам, оценки рисков инфицирования и необходимости разработки и применения вакцин, а также для исследования взаимозависимости репродукции РВ при смешанных инфекциях.

Цель работы — исследование возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в Москве в 2011–2022 гг. с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Материалы и методы. Мазки носоглотки 3908 пациентов с ОРВИ исследованы с помощью ОТ-ПЦР-РВ. **Результаты.** Мониторинг распространения РВ в Москве показал циклические изменения частот с тремя доминирующими видами: вирусом гриппа А (до 31,3%), респираторно-синцитиальным вирусом (до 24,8%) и риновирусами человека (до 21,3%) в 2011–2020 гг., которые соответствовали данным из других регионов России и мировым тенденциям, и высокие частоты встречаемости SARS-CoV-2 (31,7%) в 2022 г. Рост доли неидентифицированных клинических образцов от 1,2 до 28,5% в 2022 г. свидетельствует о неполном соответствии диагностических систем современным изолятам РВ или о появлении новых видов или штаммов возбудителей. Зарегистрированы однонаправленные изменения динамики для 5 из 9 изучаемых РВ с коэффициентами корреляции 0,43–0,79. Высокие частоты смешанных ОРВИ (до 33,4%) наряду с неидентифицированными образцами не позволяют точно оценить риски инфицирования различными РВ в Москве, однако доказывают необходимость профилактики инфекционных заболеваний наиболее распространёнными РВ.

Заключение. Анализ динамики частот распространения РВ в Москве показал сохранение доминирующих видов: вируса гриппа А, респираторно-синцитиального вируса и риновирусов человека. В период вакцинации против COVID-19 увеличилась доля сезонных коронавирусов.

Ключевые слова: респираторные вирусы, обратная транскрипция с ПЦР в реальном времени, респираторно-синцитиальный вирус (*hRSv*), метапневмовирус (*hMPV*), вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4-го типов (*hPIV*), сезонные коронавирусы (*hCoV*) и SARS-CoV-2, риновирусы человека (*hRV*), аденовирусы групп В, С и Е (*hAdV*), бокавирус человека (*hBoV*), вирусы гриппа А (*INF-A*) и В (*INF-B*)

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 18 от 21.02.2022).

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: Ветрова Е.Н., Чернышова А.И., Притчина Т.Н., Исаева Е.И., Морозова О.В. Мониторинг респираторных вирусных инфекций в 2011–2022 годах в Москве. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):328–337.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-376>

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

Introduction

Acute respiratory viral infections (ARVI) account for about 90% of reported infections annually. In the world, according to the World Health Organization, 2–5 million cases of ARVI are registered annually with fatal outcomes ranging from 290,000 to 650,000 [1]. In Russia, according to Federal Service for Sur-

veillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 27.3–41.2 million cases are detected annually [2, 3]. At the same time, 99% of ARVI are diagnosed in children under 5 years of age, mainly in developing countries [4]. Influenza predominates among acute respiratory infections: 5–20% in adults and 20–30% in children [5]. Respiratory viruses (RV) en-

ter the respiratory tract by airborne droplets, replicate in epithelial cells, and infect other organs and tissues, causing fever, headache, runny nose, sore throat, and cough. Besides fever forms of ARVI, complications in the form of encephalitis, paralysis, and death have been described [6]. The peculiarities of the course of ARVI and possible complications are determined by the properties of the RV (reproductive activity, virulence, pathogenicity), innate nonspecific resistance and specific immunity of the host [7, 8]. Frequent acute respiratory infections may suggest disorders of innate resistance and specific immunity.

Since the symptoms of ARVI are similar, detection of RV by reverse transcription with subsequent polymerase chain reaction with fluorescent hydrolysis probes detection in real time (RT²-PCR) is the most specific, sensitive, and widely used method along with multiplex immunofluorescence analysis and isolation of infectious strains in permissive cell cultures [4]. However, the phenogenetic variability of viruses due to spontaneous mutagenesis, genetic rearrangements of viral quasispecies of RNA viruses, reassortment of segmented genomes, and the absence of viral and cellular RNA repair systems hampers the development of diagnostic systems and is the cause of false-negative results and unidentified etiologic agents of ARVI.

Currently, more than 200 species of viruses causing respiratory diseases are known, with the total number reaching 300, taking into account different serotypes [9]. Of these, 8 families of viruses are the most widespread:

- DNA viruses *Adenoviridae* (over 50 types of adenoviruses), *Parvoviridae* — bocavirus (2 types);
- RNA viruses *Orthomyxoviridae* — Influenza virus (types A, B, C), *Paramixoviridae* — parainfluenza virus (type 4);
- metapneumovirus (types A, B);
- *Pneumoviridae* — respiratory syncytial virus (type 2);
- *Coronaviridae* — coronaviruses (5 types);
- *Picornoviridae* — rhinoviruses (over 100 types),
- enteroviruses (over 90 types);
- *Reoviridae* — reovirus [6, 10].

An increase in the proportion of mixed viral and viral-bacterial associations was noted. The relative frequencies of detection of ARVI pathogens vary depending on geographic localization, age of patients, methods of clinical specimen collection, duration of investigation and methods of pathogen identification [10].

During the COVID-19 pandemic, quarantine measures, social distancing and widespread use of face masks limited the spread of all respiratory infections. There was a decrease in the proportion of samples positive in RT²-PCR for respiratory infections from 49.8% (2018–2019) to 39% (2019–2020) and then to 13.4% (2020–2021) [11].

The objective of this work was to study the causative agents of ARVI in Moscow during 2011–2022 by the RT²-PCR.

Materials and methods

Nasopharyngeal swabs from 3908 patients which were collected no later than in 7 days postinfection from the onset of ARVI in the period from 2011 to 2022 were kindly provided by the head of the infectious diseases department, Prof. L.V. Kolobukhina (Clinical Hospital of Infectious Diseases No. 1, Moscow) and Dr. M.S. Savenkova (Morozov Children's City Clinical Hospital and Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow) with the patients' informed consent. Ethical approval from the Ethics Committee of the National Research Center of Epidemiology and Microbiology of N.F. Gamaleya of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia was taken before starting the research (Approval Code # 18 2022-02-21).

RV were identified by RT²-PCR using test systems approved by the Federal Service for Surveillance in Healthcare of Russia. Total nucleic acids were isolated by lysis of clinical samples in guanidinium isothiocyanate (GITC) solution followed by alcohol precipitation using the reagent kit "PREP-NA" ("DNA-Technology"). For reverse transcription with a random hexameric oligodeoxyribonucleotides, the reagent kit "Reverta-L" ("AmpliSens") was used. RNA of respiratory syncytial virus (hRSv), metapneumovirus (hMpv), parainfluenza viruses of types 1, 2, 3 and 4 (hPiv), coronaviruses (hCov), human rhinoviruses (hRv), DNA of adenoviruses of groups B, C and E (hAdv), human bocavirus (hBov) were detected using "AmpliSens ARVI-screen-FL" kit; RNA of influenza viruses A and B (Central Research Institute of Epidemiology) — "Amplisens Influenza virus A/B-FL" kit; RNA of SARS-CoV-2 coronavirus — "RealBest RNA SARS-CoV-2" kit ("VectorBest") on DT-32 and DT-lite thermocyclers with fluorescence detection in real time ("DNA-Technology"). In case of simultaneous detection of genome fragments of more than one RV in a nasopharyngeal swab, viral infections were considered as co-infections (mixed).

In total, 3908 nasopharyngeal swabs (1 from each patient) collected in Moscow were analyzed. SARS-CoV-2 RNA detection was performed only in 2022 due to the isolation of COVID-19 patients from ARVI patients in hospitals in 2020–2021 and the need for an additional sanitary and epidemiologic permission for the research.

Statistical analysis of RV distribution was performed using the software "Microsoft Excel". Differences were considered significant at $p \leq 0.05$ [12].

Results

To analyze the distribution of ARVI etiological agents, 3908 patients were examined in Moscow in the

Table 1. Monitoring of ARVI pathogens in Moscow in 2011–2022 by RT²-PCR, frequency of occurrence, % of total number of samples

Virus	Year											
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Amount of studied samples	478	437	369	383	376	339	405	215	240	310	113	243
hRSv	11,1	20,4	19,2	14,1	4,5	24,8	10,4	2,9	3,2	12,7	0,0	0,0
hMpv	13,4	3,2	7,0	5,5	1,6	1,8	3,7	6,6	6,6	5,2	4,4	0,0
hPiv	3,8	5,0	3,8	6,0	13,6	1,5	7,9	6,0	6,7	1,3	6,2	2,7
hCov	4,0	2,5	6,5	9,9	1,3	1,2	3,0	1,9	3,9	3,6	19,5	0,0
hRV	14,9	21,3	18,4	13,6	2,1	11,5	12,3	7,9	8,8	15,2	7,1	0,0
hAdv	13,4	1,1	6,0	8,6	25,0	2,9	4,4	10,3	8,3	6,5	5,3	5,9
hBov	2,9	2,1	4,6	4,7	0,8	11,2	6,2	2,3	2,6	10,7	0,9	0,0
INF-A	19,2	34,3	10,0	14,9	21,3	20,4	15,3	17,3	19,0	12,7	1,8	1,2
INF-B	1,7	0,5	4,1	1,0	2,1	8,3	4,4	0,8	1,2	3,2	0,0	1,2
Mix	12,1	7,8	17,3	19,3	25,5	15,3	26,7	29,9	33,4	24,1	31,0	28,8
N/I	3,6	1,8	3,0	2,3	2,1	1,2	5,7	14,1	6,3	4,8	23,8	28,5

Note. Mix — mixed infections; N/I — not identified samples.

period from 2011 to 2022. The frequency of detection of respiratory syncytial virus, metapneumovirus, parainfluenza viruses, seasonal coronaviruses, rhinoviruses, adenoviruses, bocavirus, influenza A and B viruses, co-infections with the detection of at least 2 RV in a sample and unidentified samples in 2011–2022 are presented in **Table 1**.

The relative frequencies of each respiratory virus varied over the 12 years of observation. Before the COVID-19 pandemic in 2011–2020, three respiratory viruses (INF-A, hRSv, and hRv) predominated, then their relative frequencies decreased significantly. Despite mass immunization against influenza with trivalent and quadrivalent vaccines containing IFN-A and IFN-B antigens in Moscow since 2017, the detection rate of the influenza A virus in nasopharyngeal swabs of ARVI patients remained high until 2020. A significant decrease in the portion of influenza A virus was observed only in 2021–2022, which could probably be due to both quarantine measures and mask regime, and the coverage of more than half of the Russian population with vaccination against influenza [5]. Noteworthy the non-synchronous and not unidirectional changes in the percentages of influenza A and B viruses. INF-B detection frequencies remained in the range from 0.5% to 4.4% throughout the entire observation period with the only exception with growth of the influenza B virus rate up to 8.3% in 2016.

A high incidence of SARS-CoV-2 (31.7%) was registered in 2022, despite nonspecific and specific prophylaxis, as well as sanitary and educational work. The use of vector vaccines against COVID-19, in particular, the "Sputnik-V" vaccine based on Ad5 and Ad26 adenoviruses, did not lead to a significant decrease in the percentage of adenoviruses in the total etiologic structure

of ARVI morbidity in Moscow (Table 1). In the absence of vaccines against most ARVI, the relative portions of the other studied RV remained minor. The maximum frequency of hMpv (13.4%) was registered in 2011 and in subsequent years did not exceed 7%. There was an increase in the frequency of mixed infections, which could be due to both disorders of innate and adaptive immunity among patients with ARVI and independent spread and increased reproduction of viruses.

In recent years, the relative rate of unidentified samples among ARVI patients with clinical symptoms has increased to 28.5% (Table 1), indicating an incomplete correspondence between licensed diagnostic test systems and circulating respiratory pathogens, the genetic diversity of strains of known viruses, and the possible emergence of new pathogens.

Analysis of the dynamics of the spread of ARVI etiological agents showed high correlation coefficients (*r*) between hRSv and hRv (*r* = 0.77), hRSv and hBov (*r* = 0.66); hRSv and INF-B (*r* = 0.64); hRSv and INF-A (*r* = 0.52); hBov and INF-B (*r* = 0.79), suggesting the existence of the first group of RV (Table 2; Figure, *a*). The second group of RV with similar distribution dynamics included hPiv and hAdv with *r* = 0.70 (Table 2; Figure, *b*).

Based on the correlation analysis of the dynamics of distribution (Table 2), 4 groups of RV were identified (Figure). Unidirectional changes were detected for 5 RV, including respiratory syncytial virus, human rhinoviruses, human bocavirus, influenza A and B viruses. Maximum values of detection frequencies of hRSv and human hRv were registered in 2012, 2016 and 2020, which suggests cyclic changes with rises every 4 years. For INF-A, high frequencies were found in 2012, 2015–2016 and 2019. This group



Dynamics of the spread of respiratory viruses in 2011–2022.

is distinguished by similar but not identical dynamics for another group consisting of hAdv and hPiv, with a maximum in 2015 (Figure, *b*). For seasonal coronaviruses, low forward and inverse correlation coefficients (Table 2) indicated independent distribution with two peaks in 2014 and 2021 (Figure, *c*). The hMpv detection frequencies were also inconsistent with the other

groups with a peak in 2011 and subsequent fluctuations at a relatively low level (Figure, *d*).

A comparative analysis of the annual mean values of RV frequencies in 5 Russian cities (Moscow, Yekaterinburg, Kazan, Rostov-on-Don, St. Petersburg) in 2014–2018, in Moscow during the years 2011–2022, and in the world (Table 3) showed the prevalence of

Table 2. Correlation coefficients of the dynamics of RV frequencies

Virus	hRSv	hMpv	hPiv	hCov	hRv	hAdv	hBov	INF-A	INF-B
hRSv	1,00	0,05	-0,41	-0,20	<i>0,77</i>	-0,40	<i>0,66</i>	<i>0,52</i>	<i>0,64</i>
hMpv	0,05	1,00	-0,15	0,19	<i>0,45</i>	0,14	-0,01	0,11	-0,20
hPiv	-0,41	-0,15	1,00	0,05	-0,38	<i>0,70</i>	-0,52	0,21	-0,31
hCov	-0,20	0,19	0,05	1,00	0,07	-0,16	-0,17	-0,45	-0,35
hRv	<i>0,77</i>	<i>0,45</i>	-0,38	0,07	1,00	-0,47	<i>0,43</i>	<i>0,49</i>	0,17
hAdv	-0,40	0,14	<i>0,70</i>	-0,16	-0,47	1,00	-0,36	0,09	-0,20
hBov	<i>0,66</i>	-0,01	-0,52	-0,17	<i>0,43</i>	-0,36	1,00	0,12	<i>0,79</i>
INF-A	<i>0,52</i>	0,11	0,21	-0,45	<i>0,49</i>	0,09	0,12	1,00	0,09
INF-B	<i>0,64</i>	-0,20	-0,31	-0,35	0,17	-0,20	<i>0,79</i>	0,09	1,00

Note. Values corresponding to high correlation coefficients ($r \geq 0.43$) are in italic; data corresponding to correlation coefficients $r \approx 0$ are in bold.

3 types of RV: INF-A, hRv, and hRSv. The dominance of RV in the world did not depend on specific prophylaxis, since the existing vaccines against influenza include INF-A and INF-B strains, vaccines against other acute respiratory viral infections are at the stage of clinical trials and are not used for mass immunization. Minimal average annual frequencies were detected for hMPV both in the world and in most regions of Russia, with the exception of Saint Petersburg (**Table 3**). At the same time, the portion of hMPV in Saint Petersburg (3.0%) was comparable to other regions of Russia. Human bocavirus was also rarely detected in most Russian cities, but global trends are not known [4].

RT²-PCR provides quantitative estimates of genome-equivalents in the reaction mixture. However, clinical samples of nasopharyngeal swabs are not standardized, that excludes the possibility of calculation the number of virions per unit of volume or per host cell. Low viral loads were a peculiarity of the results of RT²-PCR of nasopharyngeal swabs of patients with ARVI.

Discussion

ARVI are dangerous due to their ubiquitous spread, year-round circulation, high contagiousness and risk of complications, including pneumonia, acute respiratory failure, infectious toxic shock, meningitis, encephalitis, paralysis, acute distress syndrome, as well as associated chronic diseases — bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease, liver, kidney, cardiovascular diseases, leading to fatal outcomes [9]. Therefore, monitoring the distribution of etiologic agents of acute respiratory infections is necessary to improve diagnostic systems, to control their compliance with modern RV, to assess the risks of infection of the population in different regions and socio-demographic groups, the need to develop vaccines and their economically justified large-scale application.

The comparative analysis of RV distribution in Moscow showed periodic variations with preservation of dominance of three types: INF-A, hRSv and hRv, which corresponded to the spectra of etiological agents

Table 3. Comparison of annual mean frequencies of viral infections in Russia and in the world, %

Virus	Russia						World [4]
	Moscow		Ekaterinburg [13]	Kazan [13]	Rostov-on-Don [13]	St. Petersburg [13]	
	2011–2022	2014–2018 [13]					
hRSv	10,3	4,6	11,9	16,0	10,1	13,4	26,0
hMpv	4,9	0,4	3,3	1,3	3,2	3,0	3,0
hPiv	5,4	25,5	7,1	5,7	8,5	5,3	8,0
hCov	4,8	0,5	3,9	1,8	2,6	1,4	–
hRv	11,1	2,4	24,6	26,0	19,6	15,4	35,0
hAdv	8,2	6,8	4,1	5,7	18,2	6,7	4,0
hBov	4,1	0,1	1,6	4,2	3,9	2,5	–
INF-A	15,6	49,5	38,9	25,8	25,8	32,4	10,0
INF-B	2,4	10,1	4,6	13,5	8,1	20,0	5,0

Note. Cells corresponding to the dominant RV species are marked with bold font.

of ARVI in 5 cities of Russia [13, 14] and all over the world [4] (Table 3), due to globalization and determined the necessity of common measures of prevention, diagnostics and treatment. Analysis of the dynamics of RV distribution in Central Europe during 10 years also shows that influenza viruses were detected in almost half of the samples regardless of influenza immunization and quarantine restrictions during the COVID-19 pandemic [15]. Despite reports of an increase in the percentage of influenza B virus in 2019–2022 in Russia and in other countries [5, 16], the results of RV monitoring in Moscow (Table 1) showed no changes in the dominance structure. During the period of a significant decrease in the frequency of INF-A in recent years, no increase in the proportion of INF-B was found. One of the possible reasons is the coverage of the Moscow population with immunization against influenza. In Russia, the decree of the Chief State Sanitary Doctor for the 2020–2021 season sets the goal of influenza vaccination coverage of at least 60% of the population and 75% of citizens in risk groups [17]. Starting in 2017, Russia vaccinated more than 40% of the population annually, in 2019 — 50.5% of the population [5], in 2020 there was a decrease to 41.2%, with only 6.9% of children with laboratory-confirmed influenza needing hospital treatment [17]. In 2020, immunization with the Russian seasonal trivalent inactivated vaccine showed a decrease in antibody levels to all vaccine components 2.6–3.5 times below the protective level (titer in hemagglutination inhibition reaction $< 1/40$) in 6–7 months after vaccination, indicating instability of vaccine-induced humoral immunity against INF-A and INF-B viruses; dependence on the age of vaccinated persons (children 3–14 years old had a more active response compared to older persons, despite the immaturity of the immune system of children); insufficient immunogenicity of vaccine components of influenza B viruses, which led to an increase in the incidence of influenza B virus among etiological agents of ARVI (Table 1) and an increase in the incidence of influenza B, as well as an inverse correlation between the level of pre-existing antibodies to influenza viruses and the secretion of antibodies to new vaccine strains, which is due to the known effect of "original antigenic sin" [18]. One should note that the growth of influenza incidence to the maximum value in 2021 (in Russia — 14.96 per 100 thousand of the population; in Moscow — 65.99 per 100 thousand of the population) during the COVID-19 pandemic with the immune layer of more than 60% with the dominance of antibodies against the influenza B virus. The persistence of influenza A virus in the aquatic environment, among aquatic and near-water mammals and birds, determines the risks of the emergence of new mutant variants that escape from host immune system [19].

Monitoring of RV distribution in Japan showed periodic changes in hRSv frequencies with a temporary

decrease during the COVID-19 pandemic similar to our observations and high frequencies of hRV occurrence [20]. RT²-PCR screening in 26 regions of Russia in 2020 showed a maximal rhinovirus detection rate of 7.32% both in the interepidemic period and at the beginning of the epidemic season [21, 22], which corresponded to a significant portion of rhinoviruses in the etiologic structure of ARVI in Moscow in 2020 (Table 1). The proportion of individuals seropositive to rhinovirus at the beginning of 2022 was 77.8% [16], which could be due to high frequencies of human rhinovirus spread in the previous 2 years (Table 3). In Saint Petersburg, a seasonal cyclicality of circulation was revealed for the prevalent hRSv and hRV species [14]. The observed differences in frequencies are probably determined by the limited sample size, geographical and socio-demographic differences, and are a consequence of the lack of standardization of nasopharyngeal swab collection methods, instability of viral genomic RNA during storage, and rapid evolutionary variability of RV. Currently, additional methods of multiplex analysis are being developed for RV monitoring with high sensitivity and specificity based on microfluidic technologies, biosensors, liquid chromatography with mass spectrometry, etc. [23]. In addition to traditional laboratory methods, it has been proposed to use Internet-of-Things computer technologies, which, by analyzing large amounts of data on human behavior and the environment using mathematical and statistical models, increase the probability of detecting epidemic outbreaks at early stages [23].

Parainfluenza viruses in 2020 in Russia occurred with similar frequencies both in the interepidemic period (1.09%) and at the beginning of the epidemic season (1.05%). The prevalence of other etiological agents of ARVI and influenza A and B viruses did not exceed 1% on average in Russia [21]. In 2021–2022, the prevalence of SARS-CoV-2 was 15%, of human coronaviruses — 12%, the prevalence of other RV — from 0.05 to 9% [22].

In 2020–2021, with low activity of influenza viruses, the etiological role of bocavirus and metapneumovirus was found to increase, while the frequency of isolation of parainfluenza viruses, adenoviruses, rhinoviruses and respiratory syncytial virus decreased [24]. Our data (Fig. 1) also show a significant increase in the frequency of bocavirus to 10.7% in 2020. For metapneumovirus, a peak in prevalence was recorded in the previous 2018–2019, followed by a gradual decline (Fig. 1). Detection frequencies of hAdv depended on the sample studied, as adenovirus infection was prevalent in organized collectives [14].

Despite all non-specific and specific COVID-19 prevention measures in 2020–2022, the part of samples containing SARS-CoV-2 was 31.7% in 2022 (Table 1). However, seasonal coronaviruses were not detected in the absence of other RV, although the portion was 19.5% in 2021. Possible reasons were the phenogeno-

typic variability of the RNA-containing coronaviruses of the four genera: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*, among which α -coronaviruses HCoV-229E and HCoV-NL63, β -coronaviruses HCoV-OC43, HCoV-HKU1 are detected in humans with signs of acute respiratory infections, escape mutant virus variants from the host immune response and persistence of viruses in the environment, among wild reservoir hosts, domestic and farm animals. The natural reservoirs of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* are rats, birds, mammals and fish. Persistent infection with fecal excretion of viruses has been detected in poultry and pigs [19]. In addition to the widespread occurrence of coronaviruses in humans worldwide, as confirmed by retrospective serologic analysis, they are common in bats: the level of homology of amino acid sequences of SARS-CoV-2 and RaTG13 (coronavirus from bats and reptiles) is 97% [25]. Stability of parasitary systems is known to be supported by the diversity of reservoir hosts, differences in their population dynamics [26] and the persistence of viable viruses in the environment. To assess epidemiologic risks, RV monitoring by RT²-PCR with high sensitivity and specificity not only in clinical samples but also in aerosols is proposed [27].

The specific immune response induced by vaccines leads to selection of new variants of viral quasi-species of RNA-containing viruses resistant to neutralization by specific antibodies and causes acceleration of molecular evolution of viruses.

In the absence of vaccine prophylaxis against most minor ARVI, their relative portions remain stably low (Table 3), and new dangerous virus variants have no selective advantage. Prolonged co-evolution of humans and most RV has led to weakening of pathogenic properties, reduction of viral loads and host survival for successful virus reproduction and spread.

During 12 years of observation, an increase of unidentified clinical specimens from patients with symptoms of acute respiratory infections from 1.2% to 28.5% was noted, which could be due to bacterial respiratory infections with similar symptoms and/or sequence mismatches between primers and probes used in RT²-PCR and genomes of current RV. High frequencies of mixed infections in the range of 7.8–33.4% may be a consequence of the lack of virus interference during reproduction in human cells, independent reproduction of RV and/or immunodeficiencies in the Moscow population. Correlation analysis of the dynamics of RV spread (Table 3) showed significant interdependence for 5 out of 9 studied etiological agents of ARVI, including all 3 dominant species — INF-A, hRSv and hRv, as well as INF-B and hBov (Figure a). Predominant coinfection with rhinoviruses and bocavirus with high correlation coefficients have also been reported in long-term monitoring in Central Europe [15]. The second group included hAdv and hPiv ($r = 0.7$) with a peak in 2015 (Figure

b). There was no significant correlation between the distribution dynamics of seasonal coronaviruses (Table 2; Fig. c) and metapneumovirus (Fig. d) and other RV analyzed. Further monitoring is needed to analyze the correlation of the distribution dynamics of seasonal hCov (Figure, c), SARS-CoV-2, and other RV [20]. The cyclical ups and downs in the frequencies of RV detection may be due to regular changes in herd immunity associated with varying frequencies of acute respiratory infections.

The observed frequencies of mixed infections with 2 and 3 RV were higher than theoretically expected values under the assumption of independent distribution of pathogens, indicating the absence of interference between most RV, possibly due to defects in the interferon system in etiological agents of ARVI.

One should note the part of individuals infected with viruses without symptoms of acute respiratory infections is 0.25–6.09% of the population. Asymptomatic virus carriers are involved in RV circulation and increased incidence [22, 27].

Conclusion

During 2011–2022 in Moscow the etiologic structure of ARVI was rearranged with 3 dominant species remaining: influenza A virus, respiratory syncytial virus, and human rhinoviruses. During the period of restrictive measures of nonspecific prophylaxis and mass immunization against COVID-19, the portion of seasonal coronaviruses increased significantly, possibly due to α -coronaviruses.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. WHO. World Health Organization fact sheet: Influenza (Seasonal). Geneva; 2021.
2. Львов Н.И., Лихопоеико В.П. *Острые респираторные заболевания. Руководство по инфекционным болезням*. СПб.;2011:7–122. L'vov N.I., Likhopenko V.P. *Acute Respiratory Diseases. Guide to Infectious Diseases*. St. Petersburg;2011:7–122.
3. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2010 году». М.; 2011.
4. Waghmode R., Jadhav S., Nema V. The burden of respiratory viruses and their prevalence in different geographical regions of India: 1970–2020. *Front. Microbiol.* 2021;12:723850. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723850>
5. Шахтактинская Ф.Ч., Намазова-Баранова Л.С., Федосеевко М.В., Калюжная Т.А. Актуальные вопросы вакцинопрофилактики гриппа. *Вопросы современной педиатрии*. 2021;20(4):333–7. Shakhtaktinskaya F.Ch., Namazova-Baranova L.S., Fedoseenko M.V., Kaliuzhnaia T.A. Topical issues of influenza vaccine prevention. *Current Pediatrics*. 2021;20(4):333–7. DOI: <https://doi.org/10.15690/vsp.v20i4.2291> EDN: <https://elibrary.ru/iyloiz>
6. Гладких Р.А., Молочный В.П., Бутакова Л.В. и др. Клинико-этиологическая характеристика острых респираторных вирусных инфекций у госпитализированных детей города Хабаровска в эпидемических сезонах 2014–2017 гг. *Детские инфекции*. 2018;17(2):6–14. Gladkikh R.A., Molochny V.P.,

- Butakova L.V., et al. Clinical and etiological characteristics of acute respiratory viral infections in hospitalized children of the city of Khabarovsk in epidemic seasons 2014–2017. *Children infections*. 2018;17(2):6–14.
DOI: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2018-17-2-6-14>
EDN: <https://elibrary.ru/xrftet>
7. Львов Д.К. Рождение и развитие вирусологии — история изучения новых и возвращающихся вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2012;(S1):5–20. Lvov D.K. Birth and development of virology — the history of emerging-reemerging viral infection investigation. *Problems of Virology*. 2012;(S1):5–20. EDN: <https://elibrary.ru/qjanrj>
 8. Железникова Г.Ф. Инфекция и иммунитет: стратегии обеих сторон. *Медицинская иммунология*. 2006;8(5–6):597–614. Zheleznikova G.F. Infection and immunity: strategies from both sides. *Medical Immunology*. 2006;8(5–6):597–614. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2006-5-6-597-614>
EDN: <https://elibrary.ru/iixjnx>
 9. Носуля Е.В. Острая респираторно-вирусная инфекция — сложности диагностики и лечения. *Медицинский совет*. 2013;(3–2):20–6. Nosulya E.V. Acute respiratory viral infection: challenges of diagnosis and treatment. *Medical Council*. 2013;(3–2):20–6. EDN: <https://elibrary.ru/rveqj>
 10. Лазарева Н.Б., Журавлева М.В., Пантелеева Л.Р. ОРВИ: рациональная фармакотерапия с позиции клинической фармакологии. *Медицинский Совет*. 2016;(4):68–73. Lazareva N.B., Zhuravleva M.V., Panteleeva L.R. ARVI: Rational pharmacotherapy from the standpoint of clinical pharmacology. *Medical Council*. 2016;(4):68–73.
DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2016-4-68-73>
EDN: <https://elibrary.ru/tjoikd>
 11. Avolio M., Venturini S., De Rosa R., et al. Epidemiology of respiratory virus before and during COVID-19 pandemic. *Infez. Med*. 2022;30(1):104–8.
DOI: <https://doi.org/10.53854/liim-3001-12>
 12. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*. М.; 2000. Rebrova O.Yu. *Statistical Analysis of Medical Data. Application of the Package of Applied Programs STATISTICA*. Moscow; 2000.
 13. Жигарловский Б.А. *Эпидемиологическая характеристика и оптимизация эпидемиологического надзора за гриппом и ОРВИ*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2019. Zhigarlovsky B.A. *Epidemiological characteristics and optimization of epidemiological surveillance of influenza and SARS*: Diss. Moscow; 2019.
 14. Писарева М.М., Едер В.А., Бузицкая Ж.В. и др. Этиологическая структура гриппа и других ОРВИ в Санкт-Петербурге в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. *Вопросы вирусологии*. 2018;63(5):233–9. Pisareva M.M., Eder V.A., Buzitskaya Zh.V., et al. Etiological structure of influenza and other ARVI in St. Petersburg during epidemic seasons 2012–2016. *Problems of Virology*. 2018;63(5):233–9.
DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-233-239>
EDN: <https://elibrary.ru/sllvuj>
 15. Noremheb-Rubio G., Eggeling R., Schmeißer N., et al. Respiratory viruses dynamics and interactions: ten years of surveillance in Central Europe. *BMC Public Health*. 2022;22(1):1167.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13555-5>
 16. Готвянская Т.П., Мукашева Е.А., Ноздрачева А.В. и др. Заболеваемость и популяционный иммунитет к гриппу и ОРВИ в условиях пандемии COVID–19. *Санитарный врач*. 2023;(3):153–63. Gotvyanskaya T.P., Mukasheva E.A., Nozdracheva A.V., et al. Incidence and population immunity to influenza and ARVI in the context of the COVID-19 pandemic. *Sanitary Doctor*. 2023;(3):153–63.
DOI: <https://doi.org/10.33920/med-08-2303-03>
 17. Заплатников А.Л., Гирина А.А., Бурцева Е.И., Свинцицкая В.И. Вакцинация против сезонного гриппа и пандемия COVID-19: не упустить последнюю возможность. *Медицинское обозрение*. 2020;4(11):687–90. Zaplatnikov A.L., Garina A.A., Burtseva E.I., Svinitskaya V.I. Seasonal flu shot and the COVID-19 pandemic: don't miss the last chance. *Russian Medical Inquiry*. 2020;4(11):687–90.
DOI: <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-11-687-690>
EDN: <https://elibrary.ru/ybtpty>
 18. Кривицкая В.З., Кузнецова Е.В., Майорова В.Г. и др. Влияние вакцинации против гриппа на уровень специфического гуморального иммунитета здоровых лиц. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(1):127–41. Krivitskaya V.Z., Kuznesova E.V., Maiorova V.G., et al. Influenza vaccination influencing level of specific humoral immunity in healthy individuals. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(1):127–41.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-IVI-1750>
EDN: <https://elibrary.ru/kkhkqd>
 19. Львов Д.К., ред. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.; 2013. Lvov D.K., ed. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals*. Moscow; 2013.
 20. Hamamoto I., Shimasaki N. The importance of monitoring viral respiratory infections during the COVID-19 crisis. *J. Disaster Res*. 2022;17(1):73–81.
DOI: <https://doi.org/10.20965/jdr.2022.p0073>
 21. Яцьшина С.Б., Мамошина М.В., Елькина М.А. и др. Распространённость возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у лиц без симптомов респираторной инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):383–96. Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Elkina M.A., et al. Prevalence of ARVI, Influenza, and COVID-19 pathogens in individuals without symptoms of respiratory infection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(4):383–96.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-152>
EDN: <https://elibrary.ru/skidig>
 22. Мамошина М.В., Яцьшина С.Б., Акимкин В.Г. Анализ результатов мониторинга возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у бессимптомных лиц. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2023;(2):63–9. Mamoshina M.V., Yatsyshina S.B., Akimkin V.G. Analysis of the results of monitoring the pathogens of acute respiratory viral infection, influenza, and COVID-19 in asymptomatic individuals. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2023;(2):63–9.
DOI: <https://doi.org/10.18565/epidem.2023.13.2.63-9>
 23. Gradisteanu Pircalabioru G., Iliescu F.S., Mihaescu G., et al. Advances in the rapid diagnostic of viral respiratory tract infections. *Front. Cell Infect. Microbiol*. 2022;12:807253.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.807253>
 24. Гирина А.А., Заплатников А.Л., Бурцева Е.И. и др. Иммунопрофилактика гриппа, острых и рекуррентных респираторных инфекций в период пандемии COVID-19. *Медицинский Совет*. 2021;(17):111–20. Girina A.A., Zaplatnikov A.L., Burtseva E.I., et al. Immunoprophylaxis of influenza, acute and recurrent respiratory infections during the COVID-19 pandemic. *Medical Council*. 2021;(17):111–20.
DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-17-111-120>
EDN: <https://elibrary.ru/tqaabm>
 25. Fischer H., Tschachler E., Eckhart L. Pangolins lack IFIH1/MDA5, a cytoplasmic RNA sensor that initiates innate immune defense upon coronavirus infection. *Front. Immunol*. 2020;11:939. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00939>
 26. Bakhvalova V.N., Panov V.V., Morozova O.V. Tick-Borne encephalitis virus quasisppecies rearrangements in ticks and mammals. In: Růžek D., ed. *Flavivirus Encephalitis*. InTech; 2011. DOI: <https://doi.org/10.5772/20744>
 27. Yadana S., Coleman K.K., Nguyen T.T., et al. Monitoring for airborne respiratory viruses in a general pediatric ward in Singapore. *J. Public Health Res*. 2019;8(3):1407.
DOI: <https://doi.org/10.4081/jphr.2019.1407>

Information about the authors

Elizaveta N. Vetrova[✉] — researcher, Laboratory of immunology, National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, immunol.lab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1902-5278>

Alyona I. Chernyshova — researcher, Laboratory of immunology, National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1290-4042>

Tatiana N. Pritchina — researcher, Laboratory of immunology, National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3418-2394>

Olga V. Morozova — D. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunology, National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia; leading researcher, Laboratory of medical nanotechnology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9630-0777>

Author contribution: *Vetrova E.N.* — research, analysis of literature and experimental data, statistical analysis, design of figures and tables, discussion, writing of the text; *Chernyshova A.I.*, *Pritchina T.N.* — research; *Isaeva E.I.* — discussion of experimental data; *Morozova O.V.* — analysis of literature and experimental data, design of the article, writing of the text. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, 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 29.06.2023;
accepted for publication 03.08.2023;
published 28.10.2023

Информация об авторах

Ветрова Елизавета Николаевна[✉] — н.с. лаб. иммунологии Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, immunol.lab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1902-5278>

Чернышова Алёна Игоревна — н.с. лаб. иммунологии Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1290-4042>

Пritchina Татьяна Николаевна — н.с. лаб. иммунологии Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3418-2394>

Морозова Ольга Владимировна — д.б.н., с.н.с. лаб. иммунологии Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; в.н.с. лаб. медицинских нанотехнологий ФГКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9630-0777>

Участие авторов: *Ветрова Е.Н.* — проведение экспериментов, анализ литературы и экспериментальных данных, статистическая обработка, оформление рисунков и таблиц, обсуждение, написание текста и оформление статьи; *Чернышова А.И.*, *Пritchina Т.Н.* — проведение экспериментов; *Исаева Е.И.* — обсуждение экспериментальных данных; *Морозова О.В.* — анализ литературы и экспериментальных данных, обсуждение, написание текста и оформление статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 29.06.2023;
принята к публикации 03.08.2023;
опубликована 28.10.2023

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-299>

Молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции возбудителя туберкулёза в Архангельской области

Вязовая А.А.^{1✉}, Елисеев П.И.², Герасимова А.А.¹, Соловьева Н.С.³,
Никишова Е.И.², Нарвская О.В.¹, Мокроусов И.В.¹, Марьяндышев А.О.²

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

²Северный государственный медицинский университет, Архангельск, Россия;

³Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. На фоне улучшения основных эпидемиологических показателей (заболеваемость и смертность) по туберкулёзу (ТБ) в Архангельской области доля впервые выявленных больных ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя увеличилась с 18,7% в 2002 г. до 33,8% в 2018 г.

Целью исследования была генотипическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, полученных от впервые выявленных больных ТБ в Архангельской области в 2018 г.

Материалы и методы. Изучены 89 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в 2018 г. от впервые выявленных больных ТБ. Принадлежность к генотипу Beijing, кластерам B0/W148 и Central-Asian/Russian Beijing определяли с помощью ПЦР-детекции специфических маркеров: инсерции IS6110 в области *dnaA-dnaN*, мутаций в кодонах 48 гена *mutT4* (CGG>GGG) и 58 гена *mutT2* (GGA>CGA), вставки IS6110 в области Rv2664-Rv2665 и Rv1359-Rv1360, замены G>A в гене *sigE*. Штаммы non-Beijing были споллиготицированы.

Результаты. Лекарственной устойчивостью обладали 41,6% (37/89), МЛУ — 33,7% штаммов. У 90% (27/30) МЛУ-штаммов устойчивость к рифампицину и изониазиду была обусловлена мутациями *groV*, *Ser531Leu* и *katG Ser315Thr*. Выявлены генотипы *M. tuberculosis*: Beijing (67,4%), T (14,6%), Ural (4,5%), Haarlem (4,5%), LAM (2,3%) и CAS1-Delhi (1,1%). Среди штаммов Beijing преобладали кластеры Central-Asian/Russian (60%; 36/60) и B0/W148 (30%; 18/60). Большинство МЛУ-штаммов принадлежали к семейству Beijing (93,3%; 28/30), из которых 64,3% (18/28) и 21,4% (6/28) — к кластерам B0/W148 и Central-Asian/Russian соответственно.

Заключение. В гетерогенной популяции возбудителя ТБ Архангельской области наиболее распространёнными были штаммы генотипа Beijing, причём в 2018 г. его доля увеличилась до 67,4% (в 1998–1999 гг. — 40,4%). Среди МЛУ-штаммов доля Beijing достигла 93,3%, из них более половины (64,3%) принадлежали к эпидемиологически и клинически значимому в России кластеру B0/W148.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, множественная лекарственная устойчивость, споллиготицирование, генотип Beijing, кластер Central-Asian/Russian, кластер B0/W148

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 61 от 02.04.2020).

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ 19-14-00013.

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

Для цитирования: Вязовая А.А., Елисеев П.И., Герасимова А.А., Соловьева Н.С., Никишова Е.И., Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Марьяндышев А.О. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции возбудителя туберкулёза в Архангельской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):338–345.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-299>

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

Molecular epidemiological monitoring of the tuberculosis pathogen in the Arkhangelsk region

Anna A. Vyazovaya¹✉, Platon I. Eliseev², Alena A. Gerasimova¹, Natalya S. Solovieva³, Elena I. Nikishova², Olga V. Narvskaya¹, Igor V. Mokrousov¹, Andrey O. Mariandyshev²

¹St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

²Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia;

³Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Against the background of improvement of the main epidemiological indicators (morbidity and mortality) for tuberculosis in the Arkhangelsk region, the proportion of newly diagnosed tuberculosis patients with multidrug-resistant pathogen (MDR-TB) increased from 18.7% in 2002 to 33.8% in 2018.

The **purpose** of this study was the genotypic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains obtained from newly diagnosed tuberculosis patients in the Arkhangelsk region in 2018.

Materials and methods. 89 *M. tuberculosis* strains isolated in 2018 from newly diagnosed tuberculosis patients were studied. Beijing genotype, its clusters B0/W148 and Central Asian/Russian were determined by PCR detection of the specific markers: IS6110 insertions in the *dnaA-dnaN* region, mutations in codons 48 of the *mutT4* gene (CGG > GGG) and 58 of the *mutT2* gene (GGA > CGA), IS6110 insertions in the Rv2664 region-Rv2665 and Rv1359-Rv1360, substitutions G > A in the *sigE* gene. Non-Beijing strains were spoligotyped.

Results. Drug resistance was detected in 41.6% (37/89), MDR — in 33.7% of strains. In 90% (27/30) of MDR strains, resistance to rifampicin and isoniazid was due to *rpoB Ser531Leu* and *katG Ser315Thr* mutations. Following *M. tuberculosis* genotypes were identified: Beijing (67.4%), T (14.6%), Ural (4.5%), Haarlem (4.5%), LAM (2.3%) and CAS1-Delhi (1.1%). Among the Beijing strains, clusters Central-Asian/Russian (60%; 36/60) and B0/W148 (30%; 18/60) prevailed. The majority of MDR strains belonged to the Beijing family (93.3%; 28/30), of which 64.3% (18/28) and 21.4% (6/28) belonged to clusters B0/W148 and Central-Asian/Russian, respectively.

Conclusion. In heterogeneous population of the causative agent of tuberculosis in the Arkhangelsk region, the most common strains were those of the Beijing genotype; in 2018 its share increased to 67.4% (40.4% in 1998–1999). Among MDR strains, the proportion of Beijing reached 93.3%, of which more than half (64.3%) belonged to the epidemiologically and clinically significant in Russia cluster B0/W148.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, multidrug resistance, spoligotyping, Beijing genotype, Central-Asian/Russian cluster, B0/W148 cluster

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the St. Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 61, April 2, 2020).

Funding source. This study was supported by Russian Science Foundation (grant 19-14-00013).

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

For citation: Vyazovaya A.A., Eliseev P.I., Gerasimova A.A., Solovieva N.S., Nikishova E.I., Narvskaya O.V., Mokrousov I.V., Mariandyshev A.O. Molecular epidemiological monitoring of the tuberculosis pathogen in the Arkhangelsk region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):338–345.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-299>

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

Введение

Эпидемическая ситуация по туберкулёзу (ТБ) в Архангельской области, крупном регионе Северо-Западного федерального округа (СЗФО) России, в 2018 г. значительно улучшилась по сравнению с 2000 г.: показатели заболеваемости и смертности на 100 тыс. населения снизились с 48,0 до 20,7 и с 16,5 до 2,0 соответственно и стали ниже средних показателей (44,4 и 5,8 соответственно) по России за 2018 г. [1–4]. Однако, по данным Федерального центра мониторинга ТБ, доля впервые выявленных

больных ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя (МЛУ-ТБ) увеличилась с 18,7% в 2002 г. до 33,8% в 2018 г. (30,4% по СЗФО, 31,9% по России) [2, 4]. В 1990-х гг. были разработаны основные технологии внутривидовой дифференциации штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, которые послужили инструментом для накопления данных о генетической структуре популяций возбудителя на территориях России [3, 5, 6]. Молекулярно-генетические исследования возбудителя ТБ, проведённые в Архангельской области

впервые в 1998–1999 гг., а затем в 2004–2006 гг., сформировали общее представление о неоднородности популяции *M. tuberculosis*, в частности о циркуляции МЛУ-штаммов генетического семейства Beijing [3, 7].

Целью настоящего исследования была генотипическая характеристика штаммов *M. tuberculosis*, полученных от впервые выявленных больных ТБ в Архангельской области в 2018 г.

Материалы и методы

Согласно официальным данным, в 2018 г. в Архангельской области впервые выявлены 198 больных ТБ лёгких (бациллярная форма — 162, культурально подтверждено — 134). Доступными для молекулярно-генетических исследований были 89 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в 2018 г. от 89 впервые выявленных больных ТБ старше 18 лет (в том числе от больных ВИЧ/ТБ — 8). Основными диагнозами были инфильтративный (65,2%) и диссеминированный (23,6%) ТБ лёгких. Все пациенты постоянно проживали в регионе (городские жители — 70,4%). Средний возраст пациентов — 44,9 ± 1,2 года; преобладали мужчины (74,2%).

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 61 от 02.04.2020).

Культивирование на среде Левенштейна–Йенсена и определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) проводили методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде и модифицированным методом пропорций в жидкой питательной среде в системе с автоматизированным учётом роста микроорганизмов «ВАСТЕС MGIT 960». Штаммы *M. tuberculosis* считали монорезистентными при наличии устойчивости к одному из ПТП (изониазид), полирезистентными — к изониазиду и этамбутолу, мультирезистентными — к рифампицину и изониазиду одновременно¹.

ДНК выделяли из чистых культур *M. tuberculosis* согласно [5]. Определение принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к генотипу Beijing, дифференциацию современной и древней сублиний Beijing, кластеров B0/W148 и Central Asian/Russian, включая субтип Central Asia Outbreak, проводили методом ПЦР, выявляя специфические последовательности нуклеотидов: инсерцию IS6110 в межгенной области *dnaA-dnaN*, мутаций в кодонах 48 гена *mutT4* (CGG > GGG) и 58 гена *mutT2* (GGA > CGA),

вставки IS6110 в области Rv2664-Rv2665, Rv1359-Rv1360, замены G>A в гене *sigE* [8, 9].

Штаммы других генетических групп (non-Beijing) сполитотипировали [6]; полученные сполитографы сравнивали с международной базой SITVIT2² и определяли сполитотип (Spoligotype International Type, SIT).

Мутации в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, определяли с помощью тест-системы GenoType MTBDRplus («Hain Life Science»).

Статистический анализ проводили с помощью программы «StatTech v. 1.2.0» («Статтех») и ресурса MedCalc³. Различия между группами определяли с использованием критерия χ^2 , статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Из 89 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в 2018 г. от впервые выявленных больных ТБ в Архангельской области, 52 (58,4%) были лекарственно-чувствительными, 7 (7,9%) — моно- и полирезистентными. МЛУ обладали 30 (33,7%) штаммов. У 90% МЛУ-штаммов устойчивость к рифампицину и изониазиду была обусловлена мутациями *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr.

К генотипу Beijing принадлежали 67,4% (60/89) штаммов *M. tuberculosis*, остальные — к группе non-Beijing (табл. 1). В субпопуляции *M. tuberculosis* Beijing (за исключением одного штамма) доминировали представители современной сублинии — кластеры Central Asian/Russian, включая субтип CAO (61,0%; 36/59), и B0/W148 (30,5%; 18/59; табл. 1).

У 29 штаммов группы non-Beijing выявлено 17 сполитотипов (представлены кластерами — 6; табл. 2). Наиболее многочисленный сполитотип SIT53, отнесённый к семейству T, включал 32% (8/25) чувствительных к ПТП штаммов. Штаммы других сполитотипов принадлежали к генетическим семействам T (14,6%), LAM (2,2%), Haarlem (4,5%), Ural (4,5%) и CAS1-Delhi (1,1%); для 5 штаммов (Unknown) генетическое семейство определено не было (табл. 2).

Из 29 штаммов *M. tuberculosis* non-Beijing 25 (86,2%) были чувствительны ко всем ПТП, и только 2 (6,9%) штамма SIT4252 обладали МЛУ (табл. 1, 2). МЛУ была ассоциирована с принадлежностью штаммов к генотипу Beijing (46,7%; 28/60; $p < 0,001$), при этом более половины (64,3%; 18/28) из них относились к кластеру B0/W148 (табл. 1).

При анализе связи мутаций устойчивости к генотипом возбудителя статистически значимых различий между группами штаммов не выявлено (табл. 3).

¹ Приказ Минздрава РФ от 29.10.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».

² URL: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>

³ URL: http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php

Таблица 1. Генотипы и лекарственная устойчивость штаммов *M. tuberculosis*

Table 1. Genotypes and drug resistance of *M. tuberculosis* strains

Генотип Genotype	Число штаммов Number of strains			
	лекарственно-чувствительные sensitive	моно- или полирезистентные mono- or polyresistance	МЛУ MDR	всего total
<i>n</i>	52	7	30	89
Beijing	27	5	28	60
современная сублиния: modern sublineage:	27	5	27	59
B0/W148			18	18
Central Asian/Russian	26	3	5	34
Central Asia Outbreak		1	1	2
другие other	1	1	3	5
древняя сублиния ancient sublineage			1	1
Non-Beijing	25	2	2	29
T	13			13
LAM	1	1		2
Ural	3	1		4
Haarlem	4			4
Unknown	3		2	5
CAS1-Delhi	1			1

Таблица 2. Характеристика штаммов *M. tuberculosis* non-Beijing

Table 2. Characteristics of *M. tuberculosis* non-Beijing strains

SIT	Профиль сполиготипирования Spoligotyping profile	Генотип Genotype	Лекарственно-чувствительные Sensitive	Моно- или полирезистентные Mono- or polyresistance	МЛУ MDR
40		T	1		
52		T	2		
53		T	8		
73		T	1		
131		T	1		
254		LAM	1		
803		LAM		1	
35		Ural	2		
262		Ural	1		
Orphan		Ural		1	
36		Haarlem	1		
47		Haarlem	1		
50		Haarlem	2		
46		Unknown	2		
56		Unknown	1		
4252		Unknown			2
26		CAS1-Delhi	1		

Статистически значимые различия между группами лиц, инфицированных штаммами *M. tuberculosis* Beijing и non-Beijing, с учётом клинико-эпидемиологических характеристик пациентов не выявлены (табл. 4).

Обсуждение

Проведённое исследование позволило определить генетическую структуру популяции возбудителя ТБ в Архангельской области в 2018 г. Две трети (67,4%) штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных, были отнесены к генотипу Beijing, широко распространённому в СЗФО и России в целом. Так, в разные годы штаммы Beijing выявляли в Калининградской (2006 г. — 40,3%; 2015 г. — 63,0%) [10, 11], Вологодской

(2018–2019 гг. — 62,2%) [12] и Мурманской (2003–2004 гг. — 44,0%; 2004–2006 гг. — 47,2%; 2017 г. — 52,2%) [5, 14, 15] областях, в республиках Карелия (2004–2006 гг. — 33,4%; 2014 г. — 53,8%) [7, 13] и Коми (2004–2006 гг. — 41,9%; 2017 г. — 56,2%) [7, 8].

В Архангельской области в 1998–1999 гг. доля генотипа Beijing в популяции возбудителя составляла 44,5%, среди них преобладали МЛУ-штаммы — 76,7% [3]. Однако следует учитывать, что О.С. Toungoussova и соавт. приводят суммарный результат исследования штаммов *M. tuberculosis* не только впервые выявленных, но и ранее леченных больных ТБ. Анализируя данные, приведенные в таблице авторами публикации [3], мы рассчитали долю штаммов Beijing впервые выявленных больных — 40,4%.

Таблица 3. Мутации устойчивости МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*

Table 3. Resistance mutations of *M. tuberculosis* MDR strains

Устойчивость Resistance	Мутации Mutations	Число штаммов, % Number of strains, %		p
		Beijing (n = 28)	non-Beijing (n = 2)	
Изониазид Isoniazid	<i>katG</i> Ser315Thr	28 (100)	2 (100)	0,972
	<i>rpoB</i> His526Asn	1 (3,6)		
Рифампицин Rifampicin	<i>rpoB</i> His526Tyr	1 (3,6)		
	<i>rpoB</i> Ser531Leu	25 (89,3)	2 (100)	
	Нет данных No data	1 (3,6)		

Таблица 4. Генотипы *M. tuberculosis* и характеристика пациентов

Table 4. Genotypes of *M. tuberculosis* and characteristics of patients

Характеристика Characteristic	Число штаммов, % Number of strains, %		p
	Beijing (n = 60)	non-Beijing (n = 29)	
Пол: Sex:			0,798
мужчины males	44 (73,3)	22 (75,9)	
женщины females	16 (26,7)	7 (24,1)	
Возраст, лет: Age, years:			0,890
18–30	7 (11,7)	2 (6,9)	
31–40	16 (26,7)	7 (24,1)	
41–50	18 (30,0)	11 (37,9)	
51–60	13 (21,7)	7 (24,1)	
> 60	6 (10,0)	2 (6,9)	
Место проживания: Place of residence:			0,695
город city	41 (68,3)	21 (72,4)	
сельская местность rural area	19 (31,7)	8 (27,6)	
Клинические формы ТБ: Clinical forms of tuberculosis:			0,339
инфильтративный ТБ лёгких infiltrative pulmonary tuberculosis	38 (63,3)	20 (69,0)	
диссеминированный ТБ лёгких disseminated pulmonary tuberculosis	13 (21,7)	8 (27,6)	
очаговый ТБ лёгких focal pulmonary tuberculosis	1 (1,7)	1 (3,4)	
фиброзно-кавернозный ТБ fibrous-cavernous tuberculosis	2 (3,3)		
прочие other	6 (10,0)		

Сравнение сопоставимых выборок — штаммов *M. tuberculosis*, полученных от впервые выявленных больных ТБ в Архангельской области, показало значимое увеличение доли генотипа Beijing с 40,4% в 1988–1999 г. [3] до 57,1% в 2004–2006 гг. [7] и 67,4% в 2018 г. ($p = 0,002$).

В Архангельской области было отмечено увеличение доли новых случаев МЛУ-ТБ: 13,5% в 1998–1999 гг. [3], 28,6%, в 2005 г. [7] и 33,8% в 2018 г.

В структуре генотипов МЛУ-штаммов впервые выявленных больных нами установлено увеличение доли Beijing с 76,7% (1998–1999 гг.) [3] до 93,3% (2018 г.) ($p = 0,071$). При этом в 2018 г. доля штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing среди МЛУ-штаммов составила 46,7%. У подавляющего большинства (89,3%) МЛУ-штаммов Beijing (2018 г.) первичная устойчивость к рифампицину и изониазиду была обусловлена мутациями *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr, что согласуется с результатами ранее проведённого исследования [3].

В табл. 5 для наглядности суммированы имеющиеся данные, позволяющие судить о гетерогенности структуры популяций *M. tuberculosis* в регионах СЗФО (включая Архангельскую область) в 2014–2018 гг. В регионах СЗФО штаммы доминирующего генотипа Beijing *M. tuberculosis* были представлены двумя основными группами [9, 16] — относительно однородным кластером B0/W148 и гетерогенным кластером Central Asian/Russian (включающим эпидемический субтип Central Asia Outbreak, ещё редкий в России).

Архангельские штаммы *M. tuberculosis*, выделенные в 1998–1999 гг., были изучены методом

анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) последовательности IS6110 [3], который считался «золотым» стандартом генотипирования и определения принадлежности возбудителя к генотипу Beijing в молекулярной эпидемиологии ТБ [5]. С учётом современных представлений о принадлежности штаммов Beijing, содержащих характерные фрагменты рестрикции *PvuII* (молекулярная масса 7100 и 9200 пар нуклеотидов) в паттернах IS6110-RFLP, к эпидемиологически и клинически значимому в России кластеру B0/W148 [17], ретроспективно была установлена принадлежность к данному кластеру 16,8% штаммов *M. tuberculosis*, выделенных как от впервые выявленных, так и от ранее леченных больных в 1998–1999 гг. [3]. В 2018 г. доля штаммов кластера B0/W148 Beijing у впервые выявленных больных ТБ лёгких составила 20,2%.

В республиках Карелия, Коми и в Калининградской области доли штаммов B0/W148 Beijing были сопоставимы, тогда как в наиболее благополучной по ТБ Вологодской области доля данного кластера (7,3%) была значительно меньше, чем в Архангельской области ($p = 0,016$; табл. 5). При этом в Архангельской области, по данным настоящего исследования, как и в Калининградской области (2015 г.) [11], МЛУ обладали все штаммы B0/W148, в Республике Карелия (2014 г.) — 92,3% [13], в Республике Коми (2017 г.) — 76,9% [8], в Вологодской области (2018–2019 гг.) — 66,7% [12].

В Архангельской области доля кластера Central Asian/Russian (включая субтип Central Asia Outbreak) — 40,5% — незначительно отличалась от

Таблица 5. Генотипы штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных ТБ лёгких на территории СЗФО (2014–2018 гг.)

Table 5. Genotypes of *M. tuberculosis* strains isolated from newly identified patients with pulmonary tuberculosis in the territories of the Northwestern Federal District (2014–2018)

Регион Region	Год Year	n	Источник Source	Доля генотипа, % Proportion of genotype, %							
				Beijing (суммарно summary)	Beijing B0/W148	Beijing Central Asian/ Russian (включая Central Asia Outbreak including Central Asia Outbreak)	T	LAM	Haarlem	Ural	
Республика Карелия Republic of Karelia	2014	67	[13]	53,8	17,9	нд	14,0	10,3	5,0	12,8	
Калининградская обл. Kaliningrad region	2015	73	[11]	63,0	19,2	нд	9,6	5,5	0	5,5	
Мурманская обл. Murmansk region	2017	67	[15]	52,2	10,4	32,8	9,0	7,5	3,0	19,4	
Республика Коми Komi Republic	2017	130	[8]	56,2	18,5	34,6	15,0	12,0	4,0	7,0	
Вологодская обл. Vologda region	2018– 2019	82	[12]	62,2	7,3	50,0	11,0	11,0	6,1	4,9	
Архангельская обл. Arkhangelsk region	2018	89	Данная работа This study	67,4	20,2	40,5	14,6	2,2	4,5	4,5	

таковых в других регионах СЗФО (табл. 5). Подавляющее большинство (72,2%) штаммов кластера Central Asian/Russian в Архангельской области были чувствительны к ПТП, и лишь 16,7% обладали МЛЮ, в то время как в Мурманской области эти значения составляли 56,5% ($p = 0,215$) и 34,8% ($p = 0,111$) [15], в Республике Коми — 46,7% ($p = 0,021$) и 28,9% ($p = 0,198$) [8], в Вологодской области — 26,8% ($p < 0,001$) и 53,7% ($p < 0,001$) [12].

Сполиготимирование позволило определить принадлежность 29 штаммов non-Beijing (2018 г.) к различным генетическим семействам: Haarlem (4,5%), Ural (4,5%), LAM (2,2%), CAS1-Delhi (1,1%) и T (14,6%). В настоящее время, с учётом накопленных данных полногеномного секвенирования, генотип T предложено не рассматривать в качестве истинной филогенетической группы *M. tuberculosis* [18, 19]. Так, показано, что штаммы T, в частности наиболее распространённого в России сполиготипа SIT53, принадлежали к различным генетическим семействам [20, 21].

По данным исследования 2004–2006 гг. [7], в субпопуляции non-Beijing *M. tuberculosis* Архангельской области преобладали штаммы группы T (22,9%) и MANU2 (10,0%), доли генотипов LAM (2,9%) и Haarlem (4,3%) были сравнимы с нашими результатами (2018 г.). Встречаемость данных генотипов non-Beijing в соседних регионах СЗФО варьировала (табл. 5). В Архангельской области доля МЛЮ-штаммов в структуре non-Beijing составляла 10,6% [3], 6,9% (2/29) и была близка к значению по Республике Коми — 8,8% [8], но ниже, чем в Вологодской — 19,4% ($p = 0,157$) [12] и Калининградской — 25,9% ($p = 0,053$) областях [11].

Заключение


Улучшение основных эпидемиологических показателей (заболеваемость и смертность) по ТБ в Архангельской области с конца 1990-х гг. сопровождалось увеличением доли впервые выявленных больных МЛЮ-ТБ. Сравнительный анализ полученных нами и ранее опубликованных результатов генотипирования штаммов *M. tuberculosis* позволяет судить о динамике структуры популяции возбудителя ТБ в Архангельской области. В 2018 г. в гетерогенной популяции *M. tuberculosis* доля штаммов доминирующего генотипа Beijing увеличилась до 67,4% (40,4% в 1998–1999 гг.). Среди МЛЮ-штаммов доля Beijing достигла 93,3%, из них более половины (64,3%) принадлежали к эпидемиологически и клинически значимому в России кластеру B0/W148. Полученные данные свидетельствуют о необходимости молекулярно-генетического мониторинга популяции возбудителя для оценки вклада различных генотипов *M. tuberculosis* в распространение МЛЮ-ТБ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Регионы России. Основные социально-экономические показатели городов: Статистический сборник. М.; 2018. Regions of Russia. The Main Socio-Economic Indicators of Cities: A Statistical Collection. Moscow; 2018.
2. Ресурсы и деятельность противотуберкулёзных организаций Российской Федерации в 2017–2018 гг.: Статистические материалы. М.; 2019. Resources and Activities of TB Organizations of the Russian Federation in 2017–2018: Statistical Materials. Moscow; 2019.
3. Toungousova O.S., Sandven P., Mariandyshev A.O., et al. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(6):1930–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1930-1937.2002> EDN: <https://elibrary.ru/ksvysg>
4. Елисеев П.И., Детьен А., Дэйкомб Р. и др. Применение молекулярно-генетических методов диагностики с целью улучшения результатов лечения МЛЮ-ТБ в Архангельской области. *Туберкулез и болезни легких.* 2021;99(8):21–6. Eliseev P.I., Detjen A., Dacombe R., et al. The use of molecular genetic diagnostic tests to improve MDR TB treatment outcomes in Arkhangelsk region. *Tuberculosis and Lung Diseases.* 2021;99(8):21–6. DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-8-21-26> EDN: <https://elibrary.ru/lallgc>
5. van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T., et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31(2):406–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.406-409.1993>
6. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(4):907–14. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>
7. Baranov A.A., Mariandyshev A.O., Mannsäker T., et al. Molecular epidemiology and drug resistance of widespread genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in northwestern Russia. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2009;13(10):1288–93.
8. Vyazovaya A., Proshina E., Gerasimova A., et al. Increased transmissibility of Russian successful strain Beijing B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis*: indirect clues from history and demographics. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2020;122:101937. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101937>
9. Shitikov E., Vyazovaya A., Malakhova M., et al. Simple assay for detection of the Central Asia outbreak clade of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J. Clin. Microbiol.* 2019;57(7):e00215–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00215-19>
10. Mokrousov I., Otten T., Zozio T., et al. At Baltic crossroads: a molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population diversity in Kaliningrad, Russia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009;55(1):13–22. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00470.x>
11. Вязовая А.А., Ахмедова Г.М., Соловьева Н.С. и др. Молекулярная эпидемиология туберкулеза в Калининградской области России: 10 лет спустя. *Инфекция и иммунитет.* 2017;7(4):367–74. Vyazovaya A.A., Akhmedova G.M., Solovieva N.S., et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Kaliningrad region of Russia: 10 years after. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2017;7(4):367–74. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-367-374> EDN: <https://elibrary.ru/ynsrhs>
12. Вязовая А.А., Лебедева И.А., Ушакова Н.Б., и др. Молекулярно-генетический анализ популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Вологодской области — регионе с низкой

- заболеваемостью туберкулезом. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(3):497–505. Vyazovaya A.A., Lebedeva I.A., Ushakova N.B., et al. Molecular and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* population in the Vologda region with low tuberculosis incidence. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(3):497–505.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-MAG-1545>
EDN: <https://elibrary.ru/tmhefj>
13. Mokrousov I., Vyazovaya A., Solovieva N., et al. Trends in molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Republic of Karelia, Russian Federation. *BMC Microbiol*. 2015;15:279.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0613-3>
14. Mäkinen J., Marjamäki M., Haanperä-Heikkinen M., et al. Extremely high prevalence of multidrug resistant tuberculosis in Murmansk, Russia: a population-based study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2011;30(9):1119–26.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1200-7>
15. Вязовая А.А., Гаврилова Н.Ю., Герасимова А.А. и др. Молекулярно-генетический мониторинг популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Мурманской области. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2022;40(2):21–7. Vyazovaya A.A., Gavrilova N.Yu., Gerasimova A.A., et al. Molecular-genetic monitoring of *Mycobacterium tuberculosis* population in Murmansk region. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2022;40(2):21–7.
DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen20224002121>
EDN: <https://www.elibrary.ru/tnvnyj>
16. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013;26(2):342–60.
DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00087-12>
17. Shitikov E.A., Bespyatykh J.A., Ischenko D.S., et al. Unusual large-scale chromosomal rearrangements in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster isolates. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84971. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084971>
18. Mokrousov I. On sunspots, click science and molecular iconography. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2018;110:91–5.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.04.004>
19. Napier G., Campino S., Merid Y., et al. Robust barcoding and identification of *Mycobacterium tuberculosis* lineages for epidemiological and clinical studies. *Genome Med*. 2020;12(1):114.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00817-3>
20. Умпелева Т.В., Вязовая А.А., Кравченко М.А. и др. Генотипирование изолятов *Mycobacterium tuberculosis* группы non-Beijing, циркулирующих в Уральском регионе. *Уральский медицинский журнал*. 2013;(2):150–4. Umpeleva T.V., Vyazovaya A.A., Kravchenko M.A., et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolate, non-Beijing group, circulating in Ural region. *Ural Medical Journal*. 2013;(2):150–4.
EDN: <https://elibrary.ru/qamfth>
21. Mokrousov I. Ubiquitous and multifaceted: SIT53 spoligotype does not correlate with any particular family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2021;126:102024.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102024>

Информация об авторах

Вязовая Анна Александровна  — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, annavyazovaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>

Елисеев Платон Иванович — к.м.н., доцент каф. фтизиопульмонологии Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9039-4557>

Герасимова Алёна Андреевна — м.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5246-8658>

Соловьёва Наталья Сергеевна — к.м.н., зав. бактериологической лабораторией Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1509-0734>

Никшова Елена Ильинична — д.м.н., профессор каф. фтизиопульмонологии Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1542-6958>

Нарвская Ольга Викторовна — д.м.н., профессор, в.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0830-5808>


Мокроусов Игорь Владиславович — д.б.н., зав. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5924-0576>

Марьяндышев Андрей Олегович — д.м.н., профессор, зав. каф. фтизиопульмонологии Северного государственного медицинского университета, Архангельск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8485-5625>

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

Статья поступила в редакцию 24.06.2022;
принята к публикации 17.09.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Anna A. Vyazovaya  — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, annavyazovaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>

Platon I. Eliseev — Cand. Sci. (Med.), associate professor, Department of phthiisopulmonology, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

Alena A. Gerasimova — junior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5246-8658>

Natalya S. Solovieva — Cand. Sci. (Med.), Head, Bacteriological laboratory, Research Institute of Phthiisopulmonology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1509-0734>

Elena I. Nikishova — Cand. Sci. (Med.), Professor, Department of phthiisopulmonology, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1542-6958>

Olga V. Narvskaya — Cand. Sci. (Med.), Professor, leading researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0830-5808>

Igor V. Mokrousov — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5924-0576>

Andrey O. Mariandyshev — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of phthiisopulmonology, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8485-5625>

Author contribution. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, 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 24.06.2022;
accepted for publication 17.09.2023;
published 28.10.2023

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>

Анализ изменения генома геновариантов *Vibrio cholerae* O1 El Tor в современный период пандемии холеры

Смирнова Н.И.[✉], Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Кутырев В.В.

Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Вариабельность генома генетических вариантов возбудителя холеры El Tor обусловила появление штаммов, несущих мутации в различных генах патогенности и лекарственной устойчивости. Такая ситуация требует оценки направления этих изменений для прогнозирования патогенного потенциала ранее неизвестных вариантов и своевременной разработки новых средств диагностики и профилактики.

Цель работы — анализ динамики изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости генетических вариантов *Vibrio cholerae* El Tor из эндемичных по холере стран и России.

Материалы и методы. Использовали секвенированные нуклеотидные последовательности полных геномов 104 штаммов *V. cholerae* El Tor, взятых из баз данных NCBI GenBank и European Nucleotide Archive, а также полногеномные сиквенсы, полученные нами. Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы UGEN v.45.1. Для построения дендрограммы по алгоритму максимальной экономии применяли программный пакет «BioNumerics v. 7.6» на основе множественного выравнивания, полученного с помощью программы «Snippy 4.6.0».

Результаты. Сопоставлены секвенированные геномы 103 штаммов геновариантов, выделенных на территории 9 эндемичных стран Азии и Африки, а также в России в 1991–2022 гг. Показано, что процесс изменения генома геновариантов был многоступенчатым и происходил за счет последовательного накопления точечных мутаций в ключевых (*ctxB* и *tcpA*) и дополнительных (*rtxA*) генах патогенности и коровых генах резистентности к антибиотикам (*gyrA*, *parC* и *carR*), а также делецией в мобильном элементе SXT. Наиболее важным стало изменение в гене *ctxB* и появление новых геновариантов с аллелем *ctxB7*, вытеснивших ранее сформированные штаммы. Анализ измененных участков генома 83 штаммов геновариантов из эндемичных регионов выявил 8 генотипов, тогда как штаммы (21 изолят), завезённые в Россию, относились лишь к 5 генотипам, включая высоковирулентные геноварианты с аллелем *ctxB7* и утраченным биоварспецифическим свойством Pol^R за счёт мутации гена *carR*. Установленная тесная филогенетическая связь геновариантов, выявленных в России, со штаммами из эндемичных стран Азии подтверждает их завоз из этого региона.

Заключение. Показано последовательное возникновение и накопление новых мутаций в генах патогенности и лекарственной устойчивости в геноме геновариантов в эндемичных регионах, что приводит к изменению их эпидемически важных свойств. Установлен завоз в Россию новых геновариантов с высокой вирулентностью, что указывает на необходимость постоянной оценки изменений генома этого патогена для своевременной разработки адекватных средств генодиагностики и профилактики.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, геноварианты, изменчивость, вирулентность, лекарственная устойчивость, филогенетические связи

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: Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ изменения генома геновариантов *Vibrio cholerae* O1 El Tor в современный период пандемии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):346–357.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>EDN: <https://www.elibrary.ru/tuekup>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>

Analysis of changes in the genome of *Vibrio cholerae* O1 El Tor genovariants during the current period of the cholera pandemic

Nina I. Smirnova[✉], Darya A. Rybalchenko, Yulii V. Lozovsky,
Yaroslav M. Krasnov, Vladimir V. Kuttyrev

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

Abstract

Introduction. The genome variability of genetic variants of El Tor cholera agent has led to the emergence of strains carrying mutations in various genes associated with epidemically important pathogen properties. This situation requires an assessment of the trends in these changes in order to predict the pathogenic potential of previously unknown variants and promptly develop new tools for their diagnostics and prevention.

The purpose of this work was to analyze the dynamic changes in pathogenicity and drug resistance genes of *V. cholerae* El Tor genetic variants from endemic countries and Russia.

Materials and methods. We analyzed complete genome nucleotide sequences of 104 *V. cholerae* El Tor strains from the NCBI Gen Bank and European Nucleotide Archive databases, as well as those obtained by us. The nucleotide sequences were analyzed using the UGEN v. 45.1 software. The dendrogram was constructed using maximum parsimony algorithm in BioNumerics v.7.6 software package based on the multiple alignment generated using the Snippy 4.6.0 program.

Results. Genomic sequences of 103 strain genovariants isolated on the territory of nine endemic countries of Asia and Africa, as well as in Russia in 1991-2022, have been compared. It is shown that the process of genovariant genome changing was multistage and occurred due to the continuous accumulation of point mutations in key (*ctxB* and *tcpA*) and additional (*rtxA*) genes of pathogenicity and core genes of antibiotic resistance (*gyrA*, *parC* and *carR*), as well as a deletion in SXT element. The most important was the change in the *ctxB* gene and the emergence of new genovariants with the *ctxB7* allele, which replaced the previously prevalent strains. Analysis of altered genome regions of 83 strains from endemic regions has revealed eight genotypes, while the strains (21 isolates) imported to Russia belonged to only five of them including highly virulent strains with the *ctxB7* allele and lost Pol^R biovar-specific feature due to *carR* gene mutation. The established close phylogenetic relatedness of genovariants from Russia with strains from endemic Asian countries confirms their importation from this region.

Conclusion. The sequential occurrence and accumulation of mutations in the pathogenicity and drug resistance genes in the genome of genovariants in endemic regions have been shown, which leads to a change in their epidemically important features. The importation of new highly virulent genovariants into Russia has been established, which indicates the need for an ongoing assessment of changes in the genome of this pathogen for the timely development of adequate means of gene diagnostics and prevention.

Keywords: *V. cholerae*, genovariants, variability, virulence, drug resistance, phylogenetic relations

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: Smirnova N.I., Rybalchenko D.A., Lozovsky Yu.V., Krasnov Ya.M., Kuttyrev V.V. Analysis of changes in the genome of *Vibrio cholerae* O1 El Tor genovariants during the current period of the cholera pandemic. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):346–357.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>

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

Введение

Семь известных пандемий холеры были вызваны токсигенными штаммами *Vibrio cholerae*, относящимися к серогруппе O1 и двум биоварам — классическому и El Tor [1]. Среди них особый интерес представляют штаммы *V. cholerae* El Tor, вызвавшие текущую, 7-ю пандемию холеры, продолжающуюся более 60 лет (с 1961 г.). Постоянные эпидемии и вспышки холеры El Tor в эндемичных

странах Азии, Африки и Америки обуславливают риск завоза этой инфекции на территорию России, не являющейся эндемичной по холере [2].

Установлено, что глобальное распространение холеры из первичного очага (Бенгальского залива) в другие страны мира происходило тремя независимыми, но перекрывающимися волнами [3]. Молекулярно-генетический анализ различных штаммов показал, что на протяжении 3 волн в геноме возбу-

дителя происходили значительные изменения. Эпидемии холеры в 1961–1991 гг. (1-я волна) вызывали токсигенные штаммы с типичными для биовара El Tor свойствами, содержащие в составе профага СТХ^{ElT} гены *ctxAB3*, кодирующие, соответственно, А- и В-субъединицы холерного токсина — ключевого фактора патогенности [4]. Однако в 1991–1994 гг. (начало 2-й волны) в Бангладеш впервые были обнаружены генетически изменённые штаммы, несущие ген *ctxB1* *V. cholerae* классического биовара — возбудителя предыдущих 6 пандемий азиатской холеры. Эти геноварианты возникли, видимо, в результате горизонтального переноса профага СТХ классического типа (СТХ^{class}) с генами *ctxAB1* от *V. cholerae* классического биовара типичным штаммам *V. cholerae* El Tor [5]. Вместе с тем геном геновариантов оказался нестабильным, и в последние два десятилетия в эндемичных регионах появились штаммы с новыми мутациями в мобильных генетических элементах, связанных с патогенностью (остров патогенности VPI-1, профаг СТХφ) или способностью к эпидемическому распространению (остров пандемичности VSP-II) [6, 7]. Возникла мутация в гене *tcpA* из острова патогенности VPI-1, кодирующем основной белок токсин-корегулируемых пилей или TCP — ключевого фактора колонизации. Новый аллель гена *tcpA* обозначили как *tcpA*^{CRIS101} [8] или *tcpA*^{CRIS}. Затем появились штаммы с новым аллелем гена *ctxB* — *ctxB7* [6]. Важным следствием таких мутаций стало усиление вирулентности возбудителя за счёт повышенной продукции холерного токсина [9, 10]. Кроме того, обнаружили вариабельность устойчивости к лекарственным препаратам, связанную с присутствием в геноме разных типов интегративного конъюгативного элемента (integrative conjugating element, ICE) SXT, несущих различный набор генов резистентности к антибиотикам [11]. Более того, у геновариантов появились мутации в коровой области хромосомы. Так, штаммы из 3-й волны в гене *rtxA*, кодирующем multifunctional autoprocessing repeats-in toxin (MARTX), имели null-мутацию (аллель *rtxA4*), которая привела к образованию стоп-кодона и утрате биосинтеза этого токсина [12]. Выявлены также 2 точечные мутации в генах *gyrA*(G248T) и *parC*(C254T), кодирующих топоизомеразы, которые обусловили формирование у патогена резистентности к налидиксовой кислоте [13]. Более того, недавно стало известно о возникновении геновариантов с мутацией в регуляторном гене *carR*(G265A), ставшей причиной утраты их устойчивости к полимиксину В — одному из фенотипических маркеров вибрионов El Tor [14].

Появление и широкое распространение различных генетических вариантов возбудителя в эндемичных очагах холеры привело к их завозу на территорию России в период 2-й и 3-й волн пан-

демии. Изучением геновариантов занимались многие исследователи [15–18]. Особое внимание было уделено установлению филогенетических связей штаммов из разных эндемичных и неэндемичных регионов [19–23]. Однако многие вопросы о динамике изменений генома геновариантов в течение длительного периода изучены недостаточно. Так, не проведён сравнительный анализ изменчивости генотипов штаммов геновариантов, выделенных в эндемичных регионах и на территории России в течение длительного периода. Между тем поиск генетических особенностей штаммов, выделенных на различных территориях и в разные временные периоды, представляет значительный интерес для понимания направления изменения вирулентных свойств возбудителя. Более того, сведения о вариабельности генов патогенности и лекарственной устойчивости новых геновариантов в случае их завоза в Россию необходимы для своевременной разработки адекватных генодиагностических и профилактических средств. Всё это определяет актуальность работы.

Цель работы — анализ динамики изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости генетических вариантов *V. cholerae* El Tor из эндемичных стран и России.

Решение поставленных вопросов было основано на анализе сиквенсов полных геномов различных штаммов геновариантов, циркулирующих в последние годы в разных эндемичных регионах и завезённых в Россию. Выбранный подход позволяет получить более полную и достоверную информацию по сравнению с другими методами об изменении указанных генов, расположенных в разных участках хромосомы.

Материалы и методы

В работе использовали секвенированные нуклеотидные последовательности полных геномов 86 штаммов геновариантов *V. cholerae* El Tor (1991–2022 гг.), взятых из баз данных NCBI GenBank и European Nucleotide Archive, а также полученные нами сиквенсы 14 штаммов геновариантов, завезённых в Россию в 1993–2014 гг., и 4 штаммов, выделенных во время вспышки холеры в 2011 г. на Украине [24] (таблица).

Для проведения исследований штаммы получали из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», где они хранились в лиофилизированном состоянии. Бактерии культивировали в бульоне и агаре LB при 37°C.

Чувствительность 18 штаммов к 2 антибиотикам определяли общепринятым диско-диффузионным методом с использованием полимиксина В (50 мкг) и налидиксовой кислоты (30 мкг) фирм «HiMedia Laboratories Pvt. Ltd» и «Oxoid».

Для проведения секвенирования выполняли выделение и очистку геномной ДНК из бактериаль-

Штаммы *V. cholerae* биовара El Tor, полногеномные нуклеотидные последовательности которых использованы в работе

Strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, the whole genome nucleotide sequences of which were used in the study

№ No.	Место и год выделения The site and year of isolation	Алель генов Allele of genes			Структура генов Genes structure			Номер доступа в Gen Bank/ENA Gen Bank/ENA access number
		<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>	
Штаммы из эндемичных стран Азии и Африки Strains from endemic Asian and African countries								
N16961	Бангладеш, 1975 Bangladesh, 1975	<i>ctxB3</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	AE003852, AE003853
V212-1	Индия, 1991 India, 1992	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	ERR018125
VC51	Индия, 1992 India, 1992	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	ERR018124
MJ-1236	Бангладеш, 1994 Bangladesh, 1994	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	CP001485
CIRS101	Бангладеш, 2002 Bangladesh, 2002	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ACVW01000000
4519	Индия, 2005 India, 2005	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERR025374
4656	Индия, 2006 India, 2006	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013258
4488	Индия, 2006 India, 2006	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013234
4551	Индия, 2007 India, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERR025357
4623	Индия, 2007 India, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013267
4646	Индия, 2007 India, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013237
VN243P07	Вьетнам, 2007 Vietnam, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR6027863
IND031	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062980
IND033	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062982
IND041	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062990
IND048	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062997
VC-6	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308703
VC-14	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308715
VC-19	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308722
VC-16	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308717
VC-8	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308705
BGD043	Бангладеш, 2010 Bangladesh, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179812
BGD113	Бангладеш, 2010 Bangladesh, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179747
NHCM-053	Бангладеш, 2011 Bangladesh, 2011	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	GCA001187105
BGD117	Бангладеш, 2011 Bangladesh, 2011	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179750
BGD056	Бангладеш, 2011 Bangladesh, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179776
IND051	Индия, 2011 India, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063000
IDH-04808	Индия, 2012 India, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX063018
BGD060	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179773
BGD065	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179774
BGD067	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179777
BGD119	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179752
BGD120	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179753
BGD122	Бангладеш, 2013 Bangladesh, 2013	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179755
BGD082	Бангладеш, 2013 Bangladesh, 2013	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179791
IND071	Индия, 2013 India, 2013	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063020
IDH-05298	Индия, 2013 India, 2013	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063023
IND079	Индия, 2013 India, 2013	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063028
IND082	Индия, 2014 India, 2014	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063031
IND090	Индия, 2014 India, 2014	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063039

Продолжение таблицы | Continuation of the Table

№ No.	Место и год выделения The site and year of isolation	Аллель генов Allele of genes			Структура генов Genes structure			Номер доступа в Gen Bank/ENA Gen Bank/ENA access number
		<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>	
BGD095	Бангладеш, 2014 Bangladesh, 2014	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179793
BGD089	Бангладеш, 2014 Bangladesh, 2014	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179789
BGD128	Бангладеш, 2015 Bangladesh, 2015	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179758
BGD132	Бангладеш, 2015 Bangladesh, 2015	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179760
Tanz 14	Танзания, 2015 Tanzania, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS2318685
UG026	Уганда, 2015 Uganda, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN08744332
4621STDY-6714750	Кения, 2015 Kenya, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS1572785
4621STDY-6714749	Кения, 2015 Kenya, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS1572784
UG020	Уганда, 2016 Uganda, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN08744331
UG010	Уганда, 2016 Uganda, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN08744330
4621STDY-6714780	Кения, 2016 Kenya, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS1572815
BGD143	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179768
BGD140	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179766
IND220	Индия, 2016 India, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX179803
IND231	Индия, 2016 India, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX179808
BGD137	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX179763
CNRVC170168	Йемен, 2016 Yemen, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2265674
CNRVC170175	Йемен, 2016 Yemen, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269613
NALMLE36	Бангладеш, 2017 Bangladesh, 2017	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIVL00000000
NALMLE34	Бангладеш, 2017 Bangladesh, 2017	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIVJ00000000
NALMLE37	Бангладеш, 2017 Bangladesh, 2017	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIVM00000000
THSTI_56695	Индия, 2017 India, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2270661
THSTI_56712	Индия, 2017 India, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2270662
CNRVC170179	Йемен, 2017 Yemen, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269617
CNRVC170208	Йемен, 2017 Yemen, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269811
CNRVC170197	Йемен, 2017 Yemen, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269710
NALMLE05	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIUG00000000
NALMLE01	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SIUC00000000
NALMLE03	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SIUE00000000
NALMLE31	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SIVG00000000
KDCP136	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297670
KDCP183	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR14297546
CMR50	Камерун, 2019 Cameroon, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN16213389
CMR44	Камерун, 2019 Cameroon, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN16213387
KDCP208	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297682
KDCP245	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297553
KDCP262	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297555
KMCP107	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297699
KMCP145	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297701
DMAVC-20	Бангладеш, 2021 Bangladesh, 2021	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514837
DMAVC-1	Бангладеш, 2022 Bangladesh, 2022	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514672
DMAVC-16	Бангладеш, 2022 Bangladesh, 2022	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514833
DMAVC-19	Бангладеш, 2022 Bangladesh, 2022	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514836

№ No.	Место и год выделения The site and year of isolation	Аллель генов Allele of genes			Структура генов Genes structure			Номер доступа в Gen Bank/ENA Gen Bank/ENA access number
		<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>	
Штаммы из Российской Федерации Strains isolated in the Russian Federation								
*M-1275	Россия, Каспийск, 1993 Russia, Kaspiysk, 1993	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	LRAF00000000
*M-1270	Россия, Набережные Челны, 1993 Russia, Naberezhnye Chelny, 1993	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	VXCC00000000
*M-1293	Россия, Республика Дагестан, 1994 Russia, Dagestan Republic, 1994	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	JFFW00000000
I-1181	Россия, Новосибирская область, 1994 Russia, Novosibirsk region, 1994	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	UCN00000000
I-1263	Россия, Иркутск, 1997 Russia, Irkutsk, 1997	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	int.	int.	JPLT00000000
*P-17644	Россия, Ачинск, 1997 Russia, Achinsk, 1997	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	int.	int.	JRTW00000000
*M-1327	Россия, Дагестан, 1998 Russia, Dagestan, 1998	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	LRFE00000000
I-1300	Россия, Южно-Сахалинск, 1999 Russia, Yuzhno-Sakhalinsk, 1999	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	JZCC00000000
*M-1344	Россия, Казань, 2001 Russia, Kazan, 2001	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	int.	int.	NEDY00000000
*M-1429	Россия, Белорецк, 2004 Russia, Beloretsk, 2004	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	LAEM00000000
*M1430	Россия, Тверь, 2005 Russia, Tver, 2005	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	AYOM00000000
*P-18899	Россия, Мурманск, 2006 Russia, Murmansk, 2006	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	LAKM00000000
*81	Россия, Ростов-на-Дону, 2014 Russia, Rostov-on-Don, 2014	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	JRQM00000000
*L-3226	Россия, Москва, 2010 Russia, Moscow, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	JDVX00000000
*L-4150	Россия, Москва, 2010 Russia, Moscow, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	JNGT00000000
*76	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	MPVL00000000
*153	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	MWRE00000000
*39	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	MWRC00000000
*186	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	PYBQ00000000
*M1509	Россия, Москва, 2012 Russia, Moscow, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	AYNL00000000
*3265/80	Россия, Москва, 2014 Russia, Moscow, 2014	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	JRQL00000000

Примечание. *Штаммы, нуклеотидные последовательности геномов которых секвенированы нами; int. — интактный.
Note. *Nucleotide sequences of strains sequenced by us; int. — intact.

ной суспензии с использованием набора «Аху Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» («Ахуген»). Клетки предварительно обрабатывали мертиолятом натрия до конечной концентрации 1 : 10 000 (0,01%) и прогревали при 56°C в течение 30 мин. Полные геномы холерных вибрионов секвенировали на генетическом анализаторе «Ion PGM» («Thermo Fisher Scientific») с использованием стандартных протоколов подготовки проб и программного обеспечения. Для картирования и поиска единичных

нуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) в полученных прочтениях использовали программный пакет «Snippy v. 4.6.0». Прочтения картировались на геном референсного штамма *V. cholerae* N16961, и затем формировалось множественное выравнивание, содержащее SNP в областях, присутствующих во всех исследуемых геномах. Для построения дендрограммы по алгоритму максимальной экономии применяли программный пакет «BioNumerics v. 7.6».

Результаты

Динамика изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости геновариантов *V. cholerae* El Tor, циркулирующих в Азии и Африке

Для анализа изменений генов патогенности и лекарственной устойчивости мы провели биоинформационный анализ участков генома, содержащих ключевые (*ctxB* и *tcpA*) и дополнительные (*rtxA*) гены патогенности, а также гены резистентности к антибиотикам, локализованные в SXT-элементе и коровой области хромосомы (гены *gyrA*, *parC* и *carR*), 83 сиквенсов клинических штаммов *V. cholerae* El Tor из эндемичных регионов, взятых из международных баз данных. Проведённый анализ штаммов, изолированных на территории Индии, Бангладеш, Непала, Йемена, Вьетнама, Танзании, Кении, Уганды и Камеруна в 1991–2022 гг., позволил выявить заметные различия в их структуре у изолятов, выделенных в разные периоды. Сравнение структуры этих генов у различных вариантов говорит о том, что процесс их изменения происходил на протяжении относительно короткого периода времени и был многоступенчатым.

Из анализа полученных нами данных динамика изменения изучаемых свойств генетических вариантов возбудителя холеры El Tor представляется следующей (рис. 1, а). Первый этап — приобретение исходными геновариантами (*ctxB1*) различных типов SXT-элемента через горизонтальный перенос генов (1993–2001 гг.). Это событие привело к формированию штаммов 2 генотипов, различающихся набором генов резистентности к антибиотикам, — *ctxB1ICEVchBan9*, содержащих 7 генов (*floR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1* и *tetAR*), кодирующих резистентность к хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаниламиду, триметоприму и тетрациклину соответственно, и *ctxB1ICEVchInd5*, имеющих лишь 5 генов (*floR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA1*) при отсутствии генов *tetAR*. Все последующие этапы были связаны с мутациями генов патогенности и коровых генов резистентности к антибиотикам.

Одно из важнейших событий на следующем этапе микроэволюции — появление геновариантов с новыми аллелями ключевых (*tcpA^{CIRS}*) и дополнительных (*rtxA4*) генов патогенности, возникших за счёт несинонимичных однонуклеотидных замен в генах *tcpA*(A266G) и *rtxA1*(G1360A). Более того, одновременно возникли две точечные мутации в генах *gyrA*(G248T) и *parC*(C254T), кодирующих топоизомеразу II (ДНК-гиразу) и топоизомеразу IV, что обеспечило формирование у патогена резистентности к налидиксовой кислоте. Такие геноварианты с генотипом *ctxB1tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*ICEVchInd5*, впервые обнаруженные в 2002 г. в Индии, были повсеместно распространены в эндемичных регионах Юго-Восточной Азии

в 2002–2007 гг. (рис. 1, а). Тем не менее, наряду с ними, в эндемичных регионах Азии продолжали циркулировать штаммы с интактными генами *ctxB1* и *rtxA1*, но с мутациями в генах *tcpA*, *gyrA*, *parC*. Среди них в Индии (2006–2010 гг.) и Бангладеш (2009–2019 гг.) преобладали штаммы с новым типом SXT — SXT^{TET}, в составе которого были гены *tetAR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA1*, но, в отличие от других SXT, отсутствовал ген *floR*. Генотип таких штаммов был обозначен как *ctxB1tcpA^{CIRS}rtxA1gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*SXT^{TET}*. Вместе с тем распространения таких геновариантов на других территориях не отмечено. Самым существенным изменением генома возбудителя, повлекшим за собой стремительное распространение современных геновариантов, стала мутация в другом ключевом гене патогенности — *ctxB1*. Однонуклеотидная замена цитозина (C) на аденин (A) в позиции 58 привела к возникновению нового аллеля *ctxB7* и появлению ранее неизвестных геновариантов с мутациями в указанных генах патогенности и устойчивости к антибиотикам (генотип *ctxB7tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*ICEVchInd5*). Тем не менее их геном продолжал изменяться.

Значимое изменение, имеющее диагностическое значение, — возникновение дополнительной точечной мутации в регуляторном гене *carR* — замена гуанина на аденин в позиции 265(*G265A*). Такая мутация привела к утрате устойчивости к полимиксину у штаммов *V. cholerae* El Tor — специфического маркера вибрионов этого биовара [10] и появлению популяции с генотипом *ctxB7tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*carR*(G265A)*ICEVchInd5*, повсеместно распространившейся в странах Азии и Африки. Последующая мутация в этих штаммах затронула геном *ICEVchInd5*. Возникла делеция размером около 10 т.п.н., при которой были утрачены 4 гена резистентности к антибиотикам (*floR*, *strA*, *strB* и *sul2*). Сохранился лишь ген *dfrA1*, определяющий устойчивость к триметоприму. Такие новые геноварианты с генотипом *ctxB7tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*carR*(G265A)*ICEVchInd5ΔVRIII* стали широко распространёнными в 2009–2019 гг. в Кении, Танзании, Уганде, а также Бангладеш, Индии, Йемене (рис. 1, а).

Таким образом, среди исследованных штаммов выявлены 8 типов генетических вариантов, различающихся набором изменённых генов патогенности и резистентности к антибиотикам.

Анализ изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости геновариантов возбудителя холеры, выделенных в России

Для выявления изменений в геноме геновариантов, завезённых в Россию в 1993–2014 гг., получили полногеномные сиквенсы 18 токсигенных штаммов, изолированных от больных (15 изолятов)

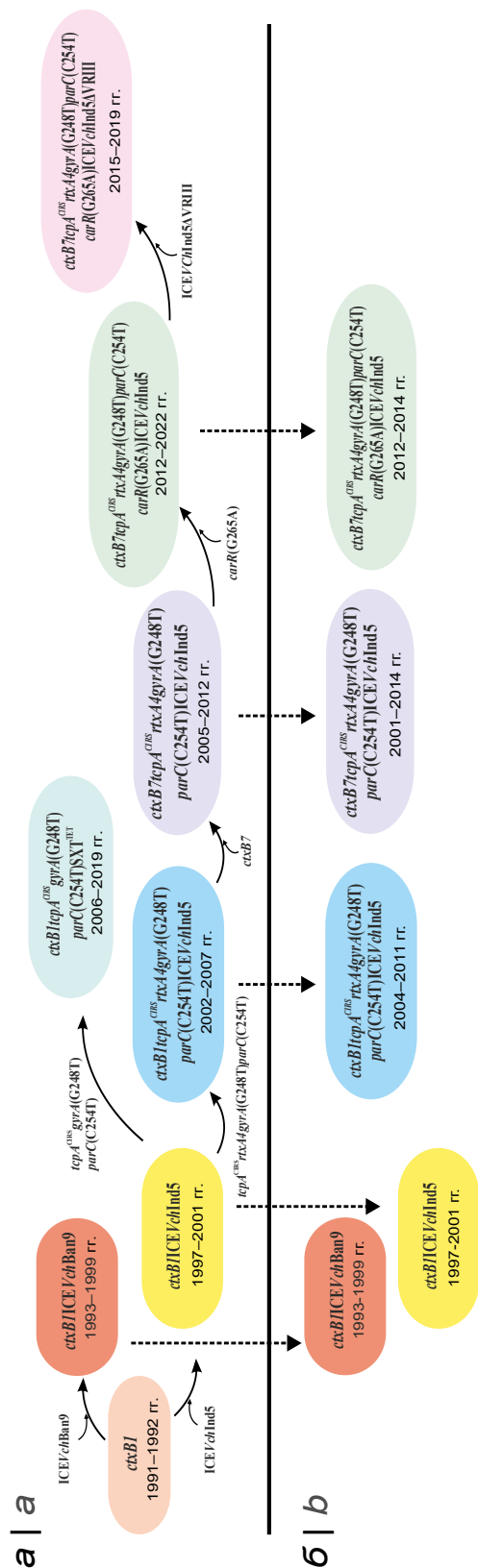


Рис. 1. Динамика изменения свойств штаммов генетических вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных на территории эндемичных по холере стран Азии и Африки (а) и России (б).

Fig. 1. Dynamics of changes in properties of *V. cholerae* O1 El Tor genovariants, isolated in endemic for cholerae Asian and Africa countries (a) and the Russian Federation (b). Vertical dotted lines indicate genotypes of strains imported to Russia from endemic countries.

и из водной среды (1 штамм) на территории России и во время вспышки холеры в 2011 г. на Украине, в Мариуполе (таблица) [24]. Затем провели анализ нуклеотидных последовательностей указанных выше генов патогенности и лекарственной устойчивости этих штаммов и 3 клинических изолятов, сиквенсы которых были получены ранее.

Установлено, что изученные штаммы в зависимости от времени завоза несли в геноме разные аллели ключевых и дополнительных генов патогенности *ctxB*, *tcpA* и *rtxA1*, а также различные типы SXT-элемента. К тому же штаммы различались наличием мутации в генах *gyrA*, *parC* и *carR*, кодирующих резистентность к антибиотикам. На рис. 1, б представлены 5 выявленных генотипов завезённых вариантов возбудителя в Россию (1993–2014 гг.) и на Украину (2011 г.) и показано время их появления на этих территориях. На ранних этапах формирования геновариантов (1994–1999 гг.) в Республику Дагестан, Южно-Сахалинск и Новосибирск из Пакистана, Саудовской Аравии, Китая и Индии соответственно [25] были завезены штаммы с *ctxB1*, в геноме которых присутствовал ICEV/chBan9 (таблица). Практически одновременно (1994–2001 гг.) в другие регионы России (Иркутск, Ачинск, Казань) из Казахстана [18] были занесены геноварианты *ctxB1* с другим типом SXT — ICEV/Ind5. Дальнейшие изменения генома привели к появлению в России других вариантов возбудителя с дополнительными мутациями в генах патогенности и коровых генах антибиотикоустойчивости. В 2004–2014 гг. в Белорецке, Твери, Мурманске и Ростове-на Дону от больных и из водной среды были выделены завезённые в основном из Индии штаммы [17] с новыми аллелями генов *tcpA* и *rtxA1* — *tcpA^{CRS}* и *rtxA4* соответственно (таблица). Более того, эти варианты возбудителя содержали ещё мутации в генах *gyrA* и *parC*, которые привели к резистентности к налидиксовой кислоте. Такие мутации в геноме оказались весьма устойчивыми, поскольку они сохранились у всех вариантов, выявленных впоследствии. Изолированные в более поздний период штаммы (Москва, Мариуполь; 2010–2014 гг.), отличаясь от предшествующих аллелем *ctxB7*, относились к новым генетическим вариантам с повышенным патогенным и эпидемическим потенциалом [6, 7]. Более того, при анализе сиквенсов среди новых вариантов возбудителя с геном *ctxB7* были обнаружены два штамма (Москва, 2010, 2014 гг.) с дополнительной мутацией в гене *carR(C254T)*, повлекшей за собой утрату резистентности к полимиксину В — диагностического маркера вибрионов El Tor (таблица).

Фенотипический анализ 18 штаммов показал, что 12 штаммов (M-1429, M1430, P-18899, 81, L-3226, L-44150, 76, 153, 39, 186, M1509, 3265/80), выделенных в 2004–2012 гг. и имеющих мутации в генах *gyrA* и *parC*, были устойчивы к налидик-

совой кислоте, тогда как 6 штаммов (M-1275, M-1270, M-1293, P-17644, M-1327, M-1344), изолированных ранее (1993–2001 гг.) и сохранивших эти гены интактными, были чувствительны к данному антибиотику. Кроме того, 2 штамма (M1509 и 3265/80) с обнаруженной мутацией в гене *carR* действительно утратили резистентность к полимиксину В (таблица).

Филогенетические связи генотипов возбудителя холеры из эндемичных стран и России

На рис. 2 представлены филогенетические связи 98 штаммов из Азии, Африки и России, установленные на основе их SNP-анализа. При сравнении полных геномов этих штаммов с референсной последовательностью штамма N16961 выявили 1606

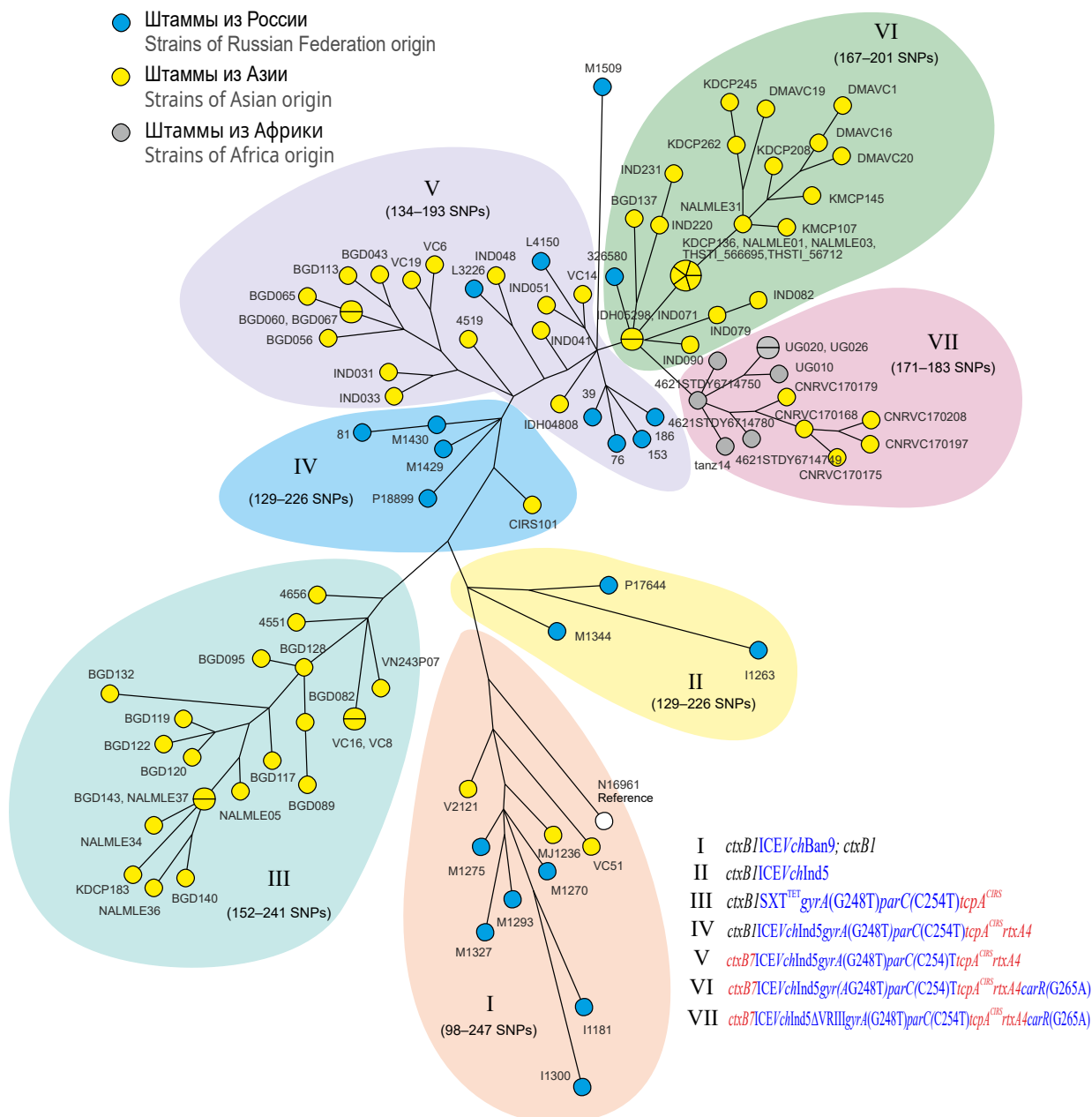


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов из кластеров I–VII генетических вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, построенное на основе полногеномного SNP-анализа.

Использована программа «BioNumerics v. 7.6», метод — maximum parsimony tree. Красным обозначены гены патогенности, синим — гены лекарственной устойчивости.

Fig. 2. Phylogenetic tree of genovariants of *V. cholerae* strains from clusters I–VII was constructed based on whole-genome SNP analysis.

Analysis was performed in BioNumerics v. 7.6 based on maximum parsimony tree algorithm. Pathogenicity genes are indicated in red, drug resistance genes are indicated in blue.

SNP в коровых генах. Построенное филогенетическое дерево и его анализ показали, что исследуемые генетические варианты возбудителя образуют 7 кластеров, в каждый из которых входили штаммы с определённым генотипом (рис. 2). Так, кластеры I и II состояли из геновариантов, изолированных в начальный период их образования (1993–1998 и 1997–2001 гг. соответственно) и различающихся присутствием в геноме разных типов SXT-элемента. Последующие поэтапные изменения генома возбудителя в процессе эволюции привели к формированию различных групп геновариантов, различающихся новыми мутациями генов патогенности и лекарственной устойчивости и вошедших в состав других 5 кластеров (III–VII), что отражает их геномное разнообразие. Наиболее удалённые от референсного штамма кластеры VI и VII образовали геноварианты, возникшие в последнее десятилетие и несущие сочетание последних наиболее существенных изменений в геноме (*ctxB7*, *carR(C254T)* и *ctxB7*, *carR(C254T)*, ICEVchInd5ΔVRIII) с ранее возникшими мутациями в генах *tcpA*, *rtxA1*, *gyrA* и *parC* (рис. 2). Тем не менее, несмотря на геномное разнообразие, представленные варианты возбудителя, изолированные в разных эндемичных и неэндемичных регионах, филогенетически связаны друг с другом. Следует особо отметить тесную филогенетическую связь геновариантов из России с изолятами из эндемичных стран Юго-Восточной Азии. В частности, такая связь была выявлена между геновариантами, завезёнными в Россию в 2004–2014 гг., и штаммами, циркулирующими в Индии в тот же период.

Обсуждение

Одним из важнейших событий в эволюции возбудителя холеры El Tor является образование первых генетических вариантов (1991 г.) за счёт приобретения им генетического материала от *V. cholerae* классического биовара — гена *ctxB1*. Однако их геном оказался нестабильным, и возникли новые варианты возбудителя с неизвестными ранее свойствами. В нашей работе впервые проведён сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ключевых и дополнительных генов патогенности, а также генов лекарственной устойчивости 104 токсигенных штаммов, циркулирующих в 9 эндемичных регионах и занесённых на территории России на протяжении длительного периода (1991–2022 гг.). Среди 83 исследованных штаммов, изолированных в эндемичных регионах Азии и Африки в 1991–2022 гг., нами выявлены 8 основных типов генетических вариантов, различающихся набором мутантных генов патогенности (точечные мутации в генах *ctxB*, *tcpA* и *rtxA1*) и резистентности к антибиотикам (разные типы SXT, точечные мутации в генах *gyrA*, *parC* и *carR* и делеция в ICEVchInd5).

Анализ динамики изменения их генома на протяжении почти 30 лет показал, что происходило последовательное накопление мутаций в генах, кодирующих эпидемически важные свойства. Следствием этих мутаций, по данным других исследователей, стало усиление вирулентности патогена за счёт повышенной продукции ХТ [9, 10], утрата Pol^R — диагностически значимого признака [14], и изменение спектра резистентности к антибиотикам. При этом каждые последующие мутации обеспечивали селективное преимущество новых геновариантов, выражающееся в большой скорости распространения и вытеснении ими ранее сформированных штаммов [1]. Наиболее существенной стала мутация в гене *ctxB1*, обусловившая появление штаммов с аллелем *ctxB7* в дополнение к другим мутациям в генах патогенности и лекарственной устойчивости. Согласно показанной нами динамике изменения генома именно эти варианты, возникшие в современный период пандемии, широко распространены в странах Азии (Индии, Бангладеш, Йемен) и Африки (Танзания, Уганда, Кения), что полностью согласуется с данными других исследователей [1, 9]. Такая ситуация позволяет прогнозировать их появление на территории России в случае завоза возбудителя холеры в результате расширения экономических и туристических связей с указанными регионами. Однако вопрос о том, какой из известных вариантов станет доминирующим в ближайшие годы, остаётся открытым, поскольку продолжающиеся изменения генома являются, видимо, одним из основных механизмов реализации стратегии выживания патогена как в организме хозяина, так и в меняющейся окружающей среде.

Поскольку возможность таких событий подтверждена выявлением в России различных генетически изменённых штаммов, встал вопрос о динамике изменения их генотипа. Получены сиквенсы геномов 18 штаммов, изолированных в России и на Украине (Мариуполь). Среднее значение покрытия полных последовательностей геномов составило 66,5. Проведённый нами анализ этих сиквенсов, а также 3 сиквенсов, полученных ранее, показал, что динамика изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости этих изолятов на протяжении более 20 лет (1993–2014 гг.) полностью соответствовала таковой штаммов, циркулирующих в эндемичных регионах в разные периоды. Важен установленный нами факт, что в последнее десятилетие были завезены новые геноварианты с высокой вирулентностью и изменённым диагностическим свойством за счёт мутаций в генах *ctxB1* и *carR*. Однако, согласно нашим данным, уровень геномного разнообразия вариантов возбудителя из России был несколько ниже, чем в эндемичных регионах. Так, пока не обнаружены штаммы с утраченными генами резистентности к 4

антибиотикам (*floR*, *strA*, *strB* и *sul2*) за счёт протяжённой делеции SXT-элемента.

При проведении филогенетического анализа установлено не только геномное разнообразие геновариантов, но и доминирование в настоящее время в эндемичных регионах недавно возникших вариантов с дополнительными мутациями в генах вирулентности и лекарственной устойчивости, которые усилили их патогенный потенциал. Показанные изменения генома возбудителя в эндемичных регионах указывают на необходимость постоянной их оценки для своевременной разработки адекватных средств генодиагностики и профилактики. Обнаружение в России новых геновариантов с ранее неизвестными мутациями и возможные новые их завозы требует разработки быстрых способов их идентификации, что будет способствовать повышению эффективности эпидемиологического надзора за холерой. В частности, полученные данные были использованы нами для разработки быстрых способов идентификации новых геновариантов с изменёнными генами патогенности и утраченным биовар-специфическим свойством методом мультилокусной полимеразной цепной реакции, что существенно ускорит их генодиагностику.

Выводы

1. Среди изученных геновариантов из 9 эндемичных стран Азии и Африки выявлены 8 генотипов, различающихся мутациями в генах патогенности и лекарственной устойчивости. Среди них глобальное распространение имеют новые высоковирулентные геноварианты с аллелем *ctxB7*.

2. Геноварианты, завезённые в Россию, относились к 5 генотипам, включая штаммы с аллелем *ctxB7* и потерянным биовар-специфическим свойством PoI^R. Установленная их тесная филогенетическая связь со штаммами из эндемичных стран Азии подтверждает их завоз из этого региона.

3. Геномное разнообразие вариантов возбудителя холеры в эндемичных регионах и их реальная возможность завоза в Россию указывают на необходимость постоянного молекулярно-генетического мониторинга возбудителя для выявления изменённых генов патогенности и лекарственной устойчивости с целью своевременной разработки адекватных средств диагностики и профилактики.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Bhandari M., Jennison A.V., Rathnayake I.U., Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – A review. *Infect. Genet. Evol.* 2021;89:104726. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104726>
- Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021;(1):43–51.
- Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., et al. Characteristics of the epidemiological situation on cholera in the world and in the Russian Federation in 2020 and forecast for 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2021;(1):43–51. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-43-51> EDN: <https://elibrary.ru/fdeehm>
- Mutreja A., Kim D.W., Thomson N., et al. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011; 477(7365):462–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10392>
- Pant A., Das B., Bhadra R.K. CTX phage of *Vibrio cholerae*: Genomics and applications. *Vaccine.* 2020;38(Suppl. 1):A7–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.034>
- Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(9):3296–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010;18(1):46–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
- Pant A., Bag S., Saha B., et al. Molecular insights into the genome dynamics and interactions between core and acquired genomes of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2020;117(38):23762–73. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2006283117>
- Reimer A.R., Van Domselaar G., Stroika S., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(11):2113–21. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1711.110794>
- Ghosh P., Sinha R., Samanta P., et al. Haitian variant *Vibrio cholerae* O1 strains manifest higher virulence in animal models. *Front. Microbiol.* 2019;10:111. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00111>
- Naha A., Mandal S.R., Samanta P., et al. Deciphering the possible role of *ctxB7* allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020;14(4):e0008128. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008128>
- Spagnoletti M., Ceccarelli D., Rieux A., et al. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio.* 2014;5(4):e01356–14. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01356-14>
- Dolores J., Satchell K.J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA*-null mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio.* 2013;4(2):1–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00624-12>
- Kim H.B., Wang M., Ahmed S., et al. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; (54):799–803. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01045-09>
- Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., et al. A point mutation in *carR* is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.* 2020;88(5):e00080–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариативность генома изменённых вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, завезённых на территорию России в современный период. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2011;26(3):102–10. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kuttyrev V.V. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2011;26(3):102–10. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416811030062> EDN: <https://elibrary.ru/ofaiwz>

16. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2017;22(4):195–200. Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Oleinikov I.P., Mishankin B.N. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2017;22(4):195–200. DOI: <http://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200> EDN: <https://elibrary.ru/zhlhhlh>
17. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A. и др. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(3):17–26. Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., et al. Endemic cholera in India and imported cholera in Russia: What is common? *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):17–26. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26>
18. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(6):587–93. Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Vodopyanov S.O., Oleinikov I.P. Improvement of the technique of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(6):587–93. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-9> EDN: <https://elibrary.ru/iskwwe>
19. Кулешов К.В., Маркелов М.Л., Дедков В.Г. и др. Филогенетический анализ геномов штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории ростовской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013;90(6):13–20. Kuleshov K.V., Markelov M.L., Dedkov V.G., et al. Phylogenetic analysis of genomes of *Vibrio cholerae* strains isolated on the territory of Rostov region. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2013;90(6):13–20. EDN: <https://elibrary.ru/tlfzut>
20. Kuleshov K.V., Vodopyanov S.O., Dedkov V.G., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016;22(11):2006–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
21. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.* 2018;60:80–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.023>
22. Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н. и др. MLVA-типирование клинических штаммов генетически измененных *Vibrio cholerae* биотипе El Tor, изолированных в России и Украине в период седьмой пандемии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(6):37–43. Savelieva I.V., Kulichenko A.N., Saveliev V.N., et al. MLVA-typing of clinical stamps of genetically changed *Vibrio cholerae* biotype El Tor insulated in Russia and Ukraine in the period of seventh pandemic cholera. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(6):37–43. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-37-43> EDN: <https://elibrary.ru/vzvtmj>
23. Смирнова Н.И., Баданин Д.В., Рыбальченко Д.А. и др. Изменчивость генома холерных вибрионов Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды текущей пандемии холеры. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021;39(2):25–37. Smirnova N.I., Badanin D.V., Rybalchenko D.A., et al. Variability of the genome of El Tor cholera vibrios isolated before the onset and in different periods of the current pandemic. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2021;39(2):25–37. DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen20213902125> EDN: <https://elibrary.ru/bvffnd>
24. Ляшко В.К. Вспышка холеры в 2011 году в Донецкой области, Украина. *Эпидемиол.* 2012;13(3):117–20. Lyashko V.K. Cholera outbreak in 2011 in Donetsk region, Ukraine. *Epidemiol.* 2012;13(3):117–20.
25. Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н. и др. Холера Эль-Тор на современном этапе пандемии: эволюция возбудителя, клинико-эпидемиологические особенности, лабораторная диагностика. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(5):917–26. Savelieva I.V., Kulichenko A.N., Saveliev V.N., et al. El Tor cholera at the contemporary stage of the seventh pandemic: pathogen evolution, clinical and epidemiological features, laboratory diagnostics. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(5):917–26. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ETC-1476>

Информация об авторах

Смирнова Нина Ивановна[✉] — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrap1@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>

Рыбальченко Дарья Александровна — м.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3117-8229>

Лозовский Юлий Владиславович — к.м.н., м.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4382-7254>

Краснов Ярослав Михайлович — к.х.н., зав. лаб. геномного и протеомного анализа Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Кутырев Владимир Викторович — д.м.н., проф., академик РАН, директор Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

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 07.07.2023;
принята к публикации 30.09.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Nina I. Smirnova[✉] — D. Sci. (Biol.), Prof., chief researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, rusrap1@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>

Darya A. Rybalchenko — junior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3117-8229>

Yulii V. Lozovskiy — Cand. Sci. (Med.), junior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4382-7254>

Yaroslav M. Krasnov — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Vladimir V. Kutyrev — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

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

The article was submitted 07.07.2023;
accepted for publication 30.09.2023;
published 28.10.2023

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-366>

Анализ циркуляции коксакивируса А6 в субъектах Дальневосточного федерального округа Российской Федерации в 2014–2019 годах

Бутакова Л.В.✉, Сапега Е.Ю., Троценко О.Е.

Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия

Аннотация

Введение. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг за энтеровирусной инфекцией (ЭВИ) в субъектах Российской Федерации показал, что коксакивирус А6 (КВ-А6) на протяжении последних лет был одним из доминирующих типов энтеровирусов (ЭВ), циркулировавших среди населения страны, и в отдельные годы явился причиной большинства вспышек ЭВИ.

Цель работы — провести анализ циркуляции КВ-А6 в субъектах Дальневосточного федерального округа (ДФО) в 2014–2019 гг. с использованием молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы. Биологический материал, поступавший из 9 субъектов ДФО, исследовали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией для обнаружения РНК ЭВ. Проводили амплификацию положительных образцов для получения нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *VP1* и *VP2* для дальнейшего установления типа ЭВ. Для молекулярно-генетического анализа дальневосточных штаммов КВ-А6 получены нуклеотидные последовательности фрагментов генов *VP1* и *3Dpol*. Построение филогенетических деревьев осуществляли с использованием Байесовых филогенетических методов.

Результаты. С 2014 по 2019 г. получены 1773 нуклеотидные последовательности неполиомиелитных ЭВ 43 типов, циркулировавших в ДФО, при этом основная часть сиквенсов принадлежала КВ-А6 (524; 29,5%). В годы наибольшей идентификации КВ-А6 в субъектах ДФО наблюдались подъёмы заболеваемости ЭВИ с регистрацией вспышечных очагов. Из клинических проявлений ЭВИ, вызванных КВ-А6, в ДФО преобладали герпангина и экзантемные формы. Филогенетический анализ показал принадлежность дальневосточных штаммов КВ-А6 к превалирующему во всём мире субгенотипу D3, а также циркуляцию в анализируемый период времени нескольких рекомбинантных форм КВ-А6 (RF-A, -H, -L, -N, -R).

Заключение. Установленное генетическое разнообразие штаммов КВ-А6, циркулировавших в субъектах ДФО в 2014–2019 гг., требует дальнейшего изучения для получения новых знаний о молекулярной эпидемиологии КВ-А6 и совершенствования системы эпидемиологического надзора за ЭВИ.

Ключевые слова: энтеровирусная инфекция, энтеровирусы, коксакивирус А6, секвенирование, филогенетический анализ, рекомбинантные формы

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии (протокол № 2 от 14.01.2014).

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: Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Троценко О.Е. Анализ циркуляции коксакивируса А6 в субъектах Дальневосточного федерального округа Российской Федерации в 2014–2019 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):358–368.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-366>EDN: <https://www.elibrary.ru/svsjaw>

Analysis of coxsackievirus A6 circulation in the territories of the Far Eastern Federal district of the Russian Federation in 2014–2019

Liudmila V. Butakova[✉], Elena Yu. Sapega, Olga E. Trotsenko

Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia

Abstract

Introduction. Molecular epidemiological monitoring of enterovirus infection (EVI) in the territories of the Russian Federation showed that coxsackievirus A6 (CVA-6) had been one of the most prevalent types of enteroviruses that circulated among the country population during last years and had caused majority of EVI outbreaks.

Objective — to evaluate coxsackievirus A6 circulation in the territories of the Far Eastern Federal district (FEFD) in 2014–2019 utilizing methods of molecular genetics.

Materials and methods. RT-PCR was employed to detect enterovirus RNA in biological material collected in 9 territories of the FEFD. In order to establish enterovirus types, amplification of positive samples was carried out to detect nucleotide sequence fragments of the *VP1* and *VP2* genes. Molecular genetic analysis of the Far Eastern CVA-6 strains was based on detection of nucleotide sequences of *VP1* and *3Dpol* gene fragments. Phylogenetic trees were constructed by the means of Bayesian phylogenetic methods.

Results. Total 1773 nucleotide sequences of 43 types of non-polio enteroviruses were obtained in 2014–2019. Majority of the sequences belonged to coxsackievirus A6 (524; 29.5%). In the years of the highest CVA-6 detection an increase in EVI incidence as well as EVI outbreaks were observed in the territories of FEFD. The most prevalent manifestations of EVI caused by CVA-6 in FEFD were herpangina and exanthemic forms. Phylogenetic analysis showed that Far Eastern strains of CVA-6 during in the analyzed period of time belonged to D3 subgenotype that is dominant in the world. The circulation of several recombinant forms of CVA-6 (RF-A, -H, -L, -N, -R) was also registered.

Conclusion. The genetic diversity of CVA-6 strains circulating in the territories of the FEFD in 2014–2019 revealed in this study requires further investigation in order to obtain new knowledge about the CVA-6 molecular epidemiology and improve the enterovirus surveillance system.

Keywords: *enterovirus infection, enteroviruses, coxsackievirus A6, sequencing, phylogenetic analysis, recombinant forms*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 2, January 14, 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: Butakova L.V., Sapega E.Yu., Trotsenko O.E. Analysis of coxsackievirus A6 circulation in the territories of the Far Eastern Federal district of the Russian Federation in 2014–2019. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):358–368.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-366>

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

Введение

Патогенными для человека являются более 100 типов энтеровирусов (ЭВ), относящихся к видам *Enterovirus A–Enterovirus D* рода *Enterovirus*, семейства *Picornaviridae*. Чаще всего энтеровирусная инфекция (ЭВИ) имеет бессимптомное или маловыраженное течение, в то же время известны более 20 клинических синдромов, вызываемых ЭВ: асептический менингит, герпангина, везикулярный стоматит с экзантемой, энцефалит, острые заболевания дыхательных путей, острый вялый паралич,

миокардит, гастроэнтерит, конъюнктивит, увеит, плевродиния, неонатальный сепсис и др. [1]. К наиболее эпидемически значимым формам ЭВИ можно отнести энтеровирусный менингит и везикулярный стоматит с экзантемой (болезнь «кисть-стопа-рот», БКСР), т.к. с ними связано большинство регистрируемых в мире вспышек ЭВИ [2].

БКСР характеризуется поражением слизистой ротоглотки, экзантемой на коже верхних и нижних конечностей, а также общими симптомами в виде лихорадки, боли в горле, недомогания. Болеют пре-

имущественно дети до 10 лет, хотя случаи заболевания регистрируются и у взрослых. При тяжёлом течении у ряда пациентов возможны развитие энцефалита, острого вялого паралича, нейрогенного отёка лёгких, миокардита, наступление смерти [3, 4].

Вызывать БКСР могут более 20 типов ЭВ, среди которых наиболее часто выявляют ЭВ А71, коксаки-вирусы (КВ) А16, А6, А10, А2, А4, А9, В2, В5 [5–7]. При этом ЭВ-А71 и КВ-А16 до недавнего времени были основными возбудителями крупных вспышек БКСР, особенно в странах Западно-Тихоокеанского региона [8, 9]. В частности, множество случаев данного заболевания с тяжёлыми осложнениями и высоким уровнем летальности зафиксировано на территории материкового Китая [10, 11]. Однако после вспышки БКСР в 2008 г. в Финляндии новый генетический вариант КВ-А6 распространился по всему миру, став одним из ведущих патогенов при последовавших вспышках БКСР в разных странах [12].

Характерная морфология и локализация сыпи при БКСР подробно описаны в 1958 г. [13]. В отличие от других ЭВ — возбудителей БКСР, КВ-А6 часто вызывает более тяжёлые и обширные, нередко болезненные поражения кожных покровов. Экзантема у пациентов может быть не только макулопапулёзной или везикулёзной, но также в виде булл, эрозий, язв, геморрагий, имитируя некоторые дерматологические заболевания (мультиформная эритема, синдром Стивенса–Джонсона, синдром Джанотти–Крости). У лиц, страдающих атопическим дерматитом, наблюдались герпесоподобные высыпания, получившие название *eczema coxsackium* [14–16]. Распространённым проявлением КВ-А6-инфекции является онихомадезис [17].

Постоянный молекулярно-эпидемиологический мониторинг за ЭВИ в субъектах Российской Федерации показал, что КВ-А6 в течение ряда лет был одним из доминирующих типов ЭВ, циркулировавших среди населения страны, и в отдельные годы детерминировал большинство вспышек ЭВИ. Так, в 2014 г. КВ-А6 идентифицирован более чем в 60% этиологически расшифрованных очагов групповой заболеваемости ЭВИ, а в 2017 г. — в 42 очагах [18, 19]. Кроме того, в 2017 г. среди российских граждан, находившихся на отдыхе в Турции, Вьетнаме, Тунисе, отмечены случаи экзантемных форм ЭВИ, в том числе БКСР, обусловленных КВ-А6 [20].

Цель настоящего исследования — провести анализ циркуляции КВ-А6 в субъектах Дальневосточного федерального округа (ДФО) с 2014 по 2019 г. с использованием молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы

Для анализа заболеваемости ЭВИ в субъектах ДФО в 2014–2019 гг. использованы данные форм государственного статистического наблюдения № 1

и № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», № 23–09 «Сведения о вспышках инфекционных заболеваний», материалы Управлений Роспотребнадзора и Центров гигиены и эпидемиологии субъектов ДФО.

Биологический материал (фекальные суспензии, носоглоточные мазки и смывы, ликвор, смывы из везикул от лиц с подозрением на ЭВИ; культуры клеток; образцы из объектов окружающей среды) для исследования молекулярно-генетическими методами с 2014 по 2019 г. поступал в лабораторию Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению ЭВИ Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора из 9 субъектов ДФО: Хабаровский, Приморский, Камчатский края, Сахалинская, Амурская, Магаданская области, Еврейская автономная область (ЕАО), Республика Саха (Якутия), Чукотский автономный округ (ЧАО). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии (протокол № 2 от 14.01.2014).

РНК ЭВ в образцах определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией с помощью набора реагентов «АмплиСенс Enterovirus-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Для положительных образцов дополнительно проводили обратную транскрипцию с использованием набора реагентов «Реверта L» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) для получения из РНК кДНК, необходимой в качестве матрицы. Для амплификации используемых для типирования ЭВ коротких фрагментов генов VP1 и VP2 применяли ранее предложенные праймеры и программы [21, 22]. Получившиеся продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. Далее проводили очистку ПЦР-ампликонов реагентами «QIAGEN» и «Диа-М», мечение ампликонов с помощью набора «BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit» («Thermo Fisher Scientific»). Очищали продукты секвенирующей реакции и проводили секвенирование на автоматическом генетическом анализаторе «ABI 3500 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems»). Тип ЭВ устанавливали, сравнивая полученные нуклеотидные последовательности с референсными, представленными в базе данных GenBank, при помощи поискового алгоритма BLAST.

Для молекулярно-генетического анализа дальневосточных КВ-А6 с помощью пар праймеров 2347s/3326a и 2407s/3296a получены 78 нуклеотидных последовательностей фрагмента капсидного белка VP1 длиной 774 нуклеотидных основания (н.о.) [23]. В результате анализа полногеномных последовательностей КВ-А6, представленных в GenBank, были подобраны праймеры для амплификации фрагмента гена полимеразы 3Dpol (753 н.о.).

Для формирования выборки референсных сиквенсов из GenBank были взяты доступные на момент проведения исследования (октябрь 2022 г.) 3142 нуклеотидные последовательности гена *VP1* длиной 915 н.о. и 737 полногеномных последовательностей КВ-А6. После проведения выравнивания в «BioEdit v. 7.2.5» были исключены последовательности, имеющие ошибки секвенирования и отличающиеся друг от друга менее чем на 5%, как рекомендуется в публикации [24].

Построение филогенетических деревьев проводили с использованием Байесовых филогенетических методов, представленных в программном обеспечении «BEAST v. 1.8.4». Статистическая достоверность филогенетического дерева подтверждена в программе «Tracer v. 1.6» (эффективный размер выборки более 200). Суммирование выборки филогенетических деревьев, созданной «BEAST v. 1.8.4», в дерево с максимальным доверием к кладам осуществляли с помощью «TreeAnnotator v. 1.8.4» с дальнейшей визуализацией в программе «FigTree v. 1.4.4».

Результаты

Всего за 2014–2019 гг. исследованы 3737 образцов биологического материала из 9 субъектов ДФО. Методом секвенирования по Сэнгеру получены 1773 нуклеотидных последовательности неполиомиелитных ЭВ 43 типов, при этом большая часть сиквенсов принадлежала КВ-А6 (524; 29,5 ± 1,1%). В основном КВ-А6 определяли из проб, собранных от людей. При исследовании положительных образцов ($n = 85$) из объектов окружающей среды КВ-А6 установлен только в 2 случаях. Вероятно, это было связано как с недостатками организации проведения мониторинга за циркуляцией полио- и неполиомиелитных ЭВ в объектах окружающей среды в некоторых субъектах округа, что привело в целом к низкому уровню

выявления ЭВ в сточной воде с помощью ПЦР, так и со слабой идентификацией представителей КВ группы А при использовании классического вирусологического метода [25].

С 2014 по 2016 г. КВ-А6 выявляли чаще других ЭВ в целом по ДФО (от 19,6 до 34,0% от общего количества неполиомиелитных ЭВ), в 2017 г. лидером по числу обнаружений был КВ-А10 (31,3%), в 2018 г. — ЕСНО 6 (23,8%), в 2019 г. снова отмечено преобладание КВ-А6 (рис. 1).

На протяжении всего анализируемого периода КВ-А6 ежегодно идентифицировали в образцах, направляемых на исследование из Хабаровского края и ЕАО. В остальных субъектах ДФО наблюдалось неравномерное выделение данного ЭВ (табл. 1). При этом нельзя уверенно говорить о том, что КВ-А6 совсем не циркулировал среди населения этих территорий. К вероятным причинам таких «провалов» в обнаружении КВ-А6 можно отнести:

- малое количество проб биологического материала, поступавших в региональный центр для молекулярного типирования из субъектов в отдельные годы либо вовсе их отсутствие, что, в свою очередь, повлияло и на определение спектра других неполиомиелитных ЭВ;
- недостаточную диагностику и регистрацию случаев ЭВИ;
- циркуляцию вариантов вируса, к которым имеется коллективный иммунитет;
- географическое положение, климатические и экономические особенности некоторых субъектов ДФО, определяющие интенсивность внешних и внутренних миграционных потоков, способствующих распространению вирусов.

Тем не менее в годы наибольшего обнаружения КВ-А6 в субъектах ДФО также регистрирова-

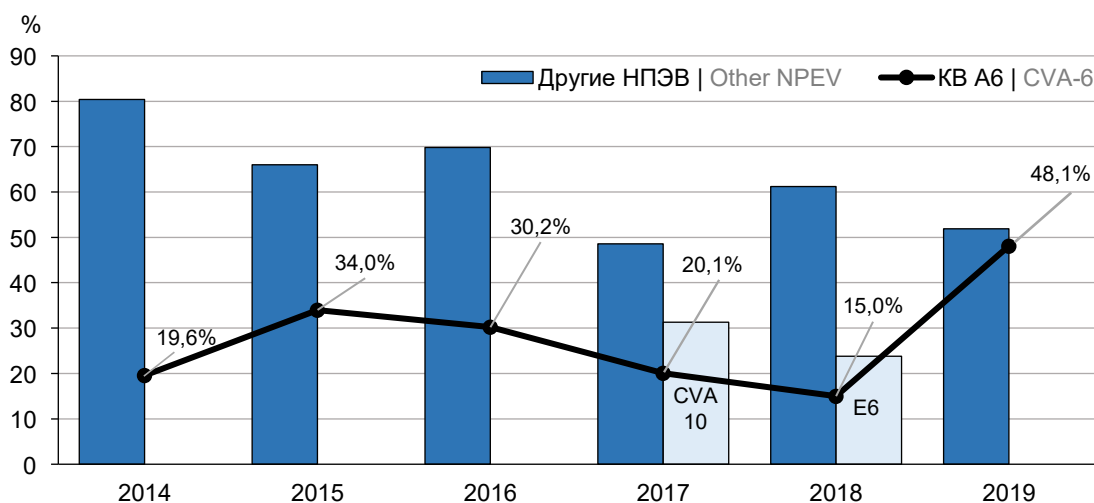


Рис. 1. Динамика обнаружения КВ-А6 в ДФО в 2014–2019 гг.

Fig. 1. Dynamics of coxsackievirus A6 detection in the Far Eastern Federal District in 2014–2019.

Таблица 1. Выявление КВ-А6 в субъектах ДФО в 2014–2019 гг.**Table 1.** Detection of coxsackievirus A6 in the territories of the Far Eastern Federal District in 2014–2019

Субъекты ДФО Federal subjects of the FEFD	Количество выявленных КВ-А6 Number of detected CVA-6						Всего КВ-А6/ неполиомиелитных ЭВ Total CVA-6/Total NPEV
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	
Хабаровский край Khabarovsk Krai	26	57	11	10	12	73	189/652
ЕАО Jewish Autonomous Region	2	35	4	1	2	14	58/270
Амурская область Amur Region	–	6	7	6	13	7	39/93
Приморский край Primorsky Krai	–	–	7	2	2	82	93/257
Сахалинская область Sakhalin Region	2	6	28	9	–	8	53/174
Республика Саха (Якутия) The Republic of Sakha (Yakutia)	23	–	1	9	5	5	43/198
Магаданская область Magadan Region	–	–	23	–	–	–	23/69
Камчатский край Kamchatka Krai	2	–	–	10	–	2	14/45
ЧАО Chukotka Autonomous Okrug	–	–	–	12	–	–	12/15

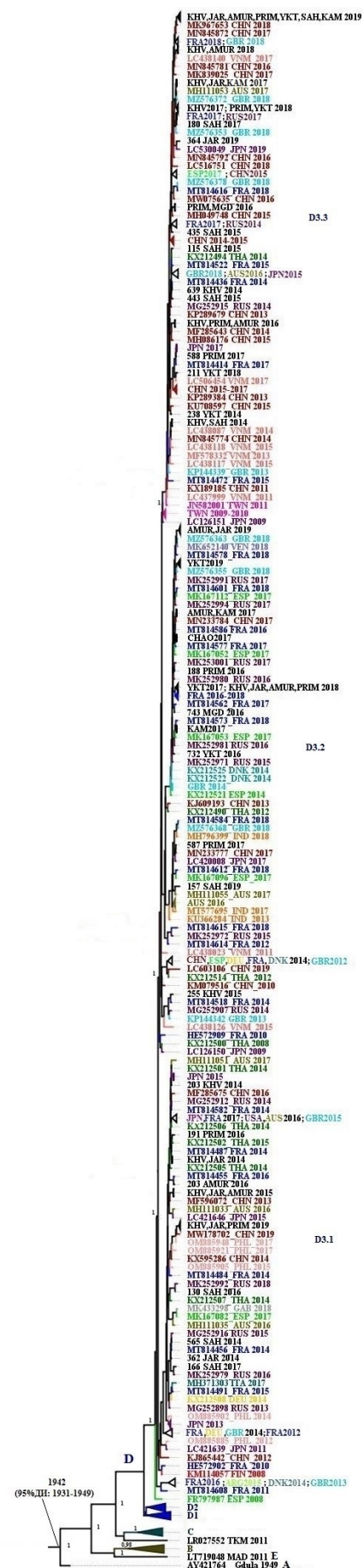
лись подъёмы заболеваемости ЭВИ, что позволяет предположить появление новых вариантов КВ-А6 на территории округа с вовлечением в эпидемический процесс неиммунного населения. Так, в 2014 г. в Республике Саха (Якутия) наблюдался рост заболеваемости ЭВИ по сравнению с предыдущим годом в 2,4 раза (2013 г. — 8,7 на 100 тыс. населения; 2014 г. — 21,1 на 100 тыс. населения). В 2015 г. темпы прироста заболеваемости ЭВИ в Хабаровском крае (105,9 на 100 тыс. населения) и ЕАО (64,1 на 100 тыс. населения) относительно 2014 г. составили 35,4 и 67,8% соответственно. В Сахалинской области в 2016 г. заболеваемость ЭВИ выросла в 4,5 раза (в 2015 г. — 22,7 на 100 тыс. населения; в 2016 г. — 103,0 на 100 тыс. населения), а в Магаданской области — в 2,0 раза (в 2015 г. — 15,9 на 100 тыс. населения; в 2016 г. — 31,7 на 100 тыс. населения). В 2017 г. увеличение заболеваемости ЭВИ в 2,6 раза отмечено в Камчатском крае (в 2016 г. — 8,8 на 100 тыс. населения; в 2017 г. — 23,2 на 100 тыс. населения). Кроме того, интродукция в 2017 г. КВ-А6 на территорию ЧАО, где ранее не было регистрации случаев ЭВИ, привела к формированию очага вспышечной заболеваемости. В Амурской области в 2018 г. темп прироста ЭВИ составил 40,5% (в 2017 г. — 14,8 на 100 тыс. населения; в 2018 г. — 20,8 на 100 тыс. населения). В 2019 г. рост заболеваемости ЭВИ наблюдался в 3,8 раза в Приморском крае (в 2018 г. — 7,5 на 100 тыс. населения; в 2019 г. — 28,7 на 100 тыс. населения), а в ЕАО (в 2018 г. — 27,8 на 100 тыс. населения; в 2019 г. — 58,7 на 100 тыс. населения) и Хабаровском крае (в 2018 г. — 58,6 на 100 тыс. населения; в 2019 г. — 62,1 на 100 тыс. населения) — в 2,1 и 1,1 раза соответственно.

Кроме того, в 2014–2019 гг. в ДФО зарегистрированы 15 очагов групповой заболеваемости ЭВИ, вызванных КВ-А6, среди детей дошкольного возраста:

- в Хабаровском крае в 2015–2016, 2019 гг. — 7 очагов, 89 пострадавших с клиническими проявлениями в виде герпангины, экзантемы, БКСР;
- в Амурской области в 2016 и 2018 гг. — 3 очага, 25 пострадавших с клиническими проявлениями в виде БКСР, экзантемы, катаральной формы;
- в Сахалинской области в 2016–2017 гг. — 2 очага, 15 пострадавших с клиническими проявлениями в виде БКСР, экзантемы, герпангины;
- в ЧАО в 2017 г. — 1 очаг, 18 пострадавших с клиникой БКСР;
- в Приморском крае в 2019 г. — 2 очага, 19 пострадавших, с клиническими проявлениями в виде экзантемы.

В 2 субъектах ДФО выявлены вероятные завозные случаи ЭВИ в форме БКСР, вызванные КВ-А6. В Хабаровском крае в 2015 г. инфекция обнаружена у 2 детей из одной семьи, прибывшей из Италии, в 2019 г. — у побывавшего в Таиланде взрослого. В Амурской области 3 года подряд (с 2016 по 2018 г.) регистрировались внутрисемейные случаи ЭВИ, развившейся в ближайшее время после возвращения из путешествия во Вьетнам.

В целом среди заболевших ЭВИ, у которых идентифицирован КВ-А6, преобладали лица мужского пола (62,4%), что сопоставимо с данными других исследователей [26]. В возрастной структуре пациентов с выявленным КВ-А6 дети до 3 лет составили 60,0%, 3–6 лет — 29,2%, 7–14 лет — 6,8%, лица старше 18 лет — 4,0%. Не всегда в направлениях на исследование были указаны формы ЭВИ, однако среди установленных клинических проявлений КВ-А6-инфекции (226 человек) у населения ДФО чаще встречались герпангина (41,2%) и экзантемные (включая БКСР) формы (36,3%). Также отмечены



катаральная (15,5%) и кишечная формы (7,0%). Неприятный характер экзантемы наблюдался у пострадавших из вспышечного очага ЭВИ в ЧАО в 2017 г., где, помимо макулопапулезных высыпаний, у детей выявлены геморрагические элементы.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *VP1* ($n = 78$) показал, что все циркулировавшие в ДФО в 2014–2019 гг. KB-A6 вошли в одну большую группу вместе со штаммами, выявленными в западных регионах России, странах Европы и Азиатско-Тихоокеанского региона (рис. 2).

В настоящее время ряд зарубежных авторов придерживается разделения штаммов KB-A6 на геногруппы A, B, C, D, E на основе филогенетического анализа полных нуклеотидных последовательностей гена *VP1* (915 н.о.). При этом различие между последовательностями, относящимися к разным геногруппам, составляет не менее 15%. В свою очередь среди геногруппы D выделяют субгенотипы D1–D3. К глобально доминирующему субгенотипу D3 принадлежат штаммы KB-A6, ответственные за большинство вспышек БКСР во всем мире за последние 15 лет [27–29]. Основываясь на этой классификации, дальневосточные штаммы KB-A6 2014–2019 гг. также относятся к субгенотипу D3.

Расчет p -расстояний для нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *VP1* (774 н.о.), полученных в ходе нашего исследования и взятых в качестве референсных из GenBank, показал, что среднее расстояние между геногруппами KB-A6 составило 17,1%, между субгенотипами геногруппы D — 9,6%.

С помощью Байесовского коалесцентного анализа установлено, что самый недавний общий предок для KB-A6 существовал 77 лет назад (95% ДИ 70–88 лет). Средняя скорость накопления замен составила $4,97 \times 10^{-3}$ замен/сайт/год (95% ДИ 4,84–5,11 $\times 10^{-3}$ замен/сайт/год), что сходно с другими данными: $4,2 \times 10^{-3}$ (95% ДИ 2,8–5,8) замен/сайт/год [23] и $4,71 \times 10^{-3}$ (95% ДИ 4,04–5,46) замен/сайт/год [30].

Внутри географически разнообразного субгенотипа D3 дальневосточные KB-A6 оказались

Рис. 2. Филогенетическое дерево с максимальным доверием к кладам, построенное на основании анализа фрагментов капсидного белка VP1 KB-A6 (774 н.о.).

Чёрным цветом выделены дальневосточные штаммы KB-A6: KHV — Хабаровский край; JAR — ЕАО; AMUR — Амурская область; PRIM — Приморский край; YKT — Республика Саха (Якутия); SAH — Сахалинская область; KAM — Камчатский край; MGD — Магаданская область; CHAO — ЧАО.

Fig. 2. The MCC phylogenetic tree constructed based on partial VP1 sequences of coxsackievirus A6 (774 b.p.).

Far Eastern CVA-6 strains are highlighted in black color: KHV — Khabarovsk Krai; JAR — Jewish Autonomous Region; AMUR — Amur Region; PRIM — Primorsky Krai; YKT — Yakutia; SAH — Sakhalin Region; KAM — Kamchatka Krai; MGD — Magadan Region; CHAO — Chukotka Autonomous Okrug.

разделены на три подгруппы, при этом отличие между штаммами разных подгрупп составило в среднем 7,2%.

Большинство полученных нами для филогенетического анализа КВ-А6 ($n = 38$; 48,7%) вошли в подгруппу **D3.3** и в основном группировались со штаммами, выделенными в Китае, Вьетнаме, Японии. Скорее всего, штаммы D3.3 произошли от КВ-А6, циркулировавших на Тайване в 2009–2010 гг., и имели общего предка примерно в 2008 г. (95% ДИ 2008–2009). Дальневосточные штаммы D3.3 идентифицированы в 8 субъектах (исключение — ЧАО) и определены в течение всего анализируемого периода в целом по ДФО.

Во второй подгруппе, **D3.2**, дальневосточные КВ-А6 ($n = 22$; 28,2%) были наиболее тесно связаны с вирусами, обнаруженными во Франции, других регионах России, Китае, Японии. Вероятным временем существования последнего общего предка для второй подгруппы определён 2006 г. (95% ДИ 2005–2007). Вирусы субклада D3.2 выявлены в разных субъектах ДФО с 2015 по 2019 г.

КВ-А6 подгруппы **D3.1** ($n = 18$; 23,1%) достоверно кластеризовались с французскими и российскими штаммами и были идентифицированы в 5 субъектах (Хабаровский и Приморский края, ЕАО, Сахалинская и Амурская области) с 2014 по 2017 г. и в 2019 г. Общий предок для D3.1 циркулировал приблизительно в 2005 г. (95% ДИ 2005–2007).

Секвенированный нами архивный изолят КВ-А6 (7224_KHV_2010) из Хабаровского края 2010 г. на филограмме сгруппировался со штаммами, входящими в субгенотип D2 (на рис. 2 не показан). Учитывая, что с 2014 г. КВ-А6 субгенотипа D2 на Дальнем Востоке не выявлены, можно допустить, что смена субгенотипов произошла между 2010 и 2014 гг.

Предложенная для ЭВ дифференциация рекомбинантных форм ЕСНО30 (Е30) используется и для КВ-А6 [31]. На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *3Dpol* (753 н.о.) КВ-А6, циркулировавшие в 2014–2019 гг. в субъектах ДФО, отнесены к 5 рекомбинантным формам: А, Н, L, N и R (рис. 3). Большинство полученных нами сиквенсов составило рекомбинантную форму А (67,9%), второй по частоте оказалась рекомбинантная форма Н (23,1%). Штамм 7224_KHV_2010 кластеризовался со штаммами рекомбинантной формы Е.

Среди дальневосточных штаммов КВ-А6, относящихся к преобладающей подгруппе **D3.3**, идентифицированы 3 рекомбинантные формы. КВ-А6 варианта **D3.3/А** ($n = 34$) сохранили ту же кластеризацию, что и на филогенетическом дереве *VP1*, выявлены в 2014 г. в Хабаровском крае, Сахалинской области и Республике Саха (Якутия); в 2015 г. — в Сахалинской области; в 2016 г. — в Хабаровском и

Приморском краях, Амурской и Сахалинской областях; в 2017 г. — в Хабаровском крае, Приморье и ЕАО; в 2018 г. — в Хабаровском и Приморском краях, Амурской области и Республике Саха (Якутия); в 2019 г. — в Хабаровском, Приморском, Камчатском краях, ЕАО, Амурской и Сахалинской областях, Республике Саха (Якутия). КВ-А6 варианта **D3.3/L** обнаружены в 2016 г. в Приморском крае и Магаданской области, **D3.3/R** — в 2017 г. в Камчатском крае.

Топология КВ-А6 из подгруппы **D3.2** на дереве для последовательностей *3Dpol* отличается от таковой в *VP1*, две рекомбинантные формы D3.2 (Н и N) сформировали обособленные кластеры. КВ-А6 варианта **D3.2/Н** ($n = 18$) в 2014–2015 гг. не выявлены; в 2016 г. циркулировали в Приморском крае, Магаданской области и Республике Саха (Якутия); в 2017 г. — в Амурской области, Республике Саха (Якутия), Камчатском крае и ЧАО; в 2018 г. — в Хабаровском, Приморском краях и ЕАО; в 2019 г. — в Республике Саха (Якутия), ЕАО и Амурской областях. Вариант **D3.2/N** обнаружен в Приморском крае в 2017 г. и Сахалинской области в 2019 г. Два штамма **D3.2/А** из Хабаровского края (2015 г.) и Амурской области (2018 г.) сгруппировались на дереве *3Dpol* вместе со штаммами D3.3/А.

Несоответствие филогенетической группировки последовательностей *3Dpol* КВ-А6 вариантов D3.2/А, D3.2/Н, D3.3/L, D3.2/N и D3.3/L по сравнению с *VP1* указывает на то, что эти штаммы возникли вследствие событий рекомбинации [32, 33].

Все 18 штаммов КВ-А6 подгруппы **D3.1** относятся к рекомбинантной форме А и также заняли то же положение, что и на дереве *VP1*. Вариант КВ-А6 D3.1/А не идентифицирован в Республике Саха (Якутия), Магаданской области, Камчатском крае и ЧАО.

Следует отметить, что в одном и том же субъекте могли одновременно циркулировать разные варианты КВ-А6. Наибольшее разнообразие выявлено в Приморском крае в 2016 г. (4 варианта: D3.3/А, D3.3/L, D3.2/Н и D3.1/А) и в ЕАО в 2019 г. (3 варианта: D3.3/А, D3.2/Н и D3.1/А).

Обсуждение

Проведённое нами исследование показало генетическое разнообразие популяции КВ-А6 в субъектах ДФО в 2014–2019 гг. После 2008 г. КВ-А6 постепенно вытеснил ЭВ А71 и КВ-А16 с позиции доминирующих возбудителей при вспышках БКСР. Произошедшая с конца 2012 г. смена доминирующего субгенотипа КВ-6, отмеченная в нескольких регионах материкового Китая, привела к значительному росту заболеваемости и увеличению числа вспышек БКСР [34, 35]. Наличие протяжённой сухопутной (проходит через 4 субъекта ДФО: Хабаровский край, ЕАО и Амурская область, Приморский край) и водной российско-китайской границы, обеспечивающей тесные социально-экономические

и туристические связи между государствами, несомненно способствовало распространению субгенотипа D3 KB-A6 на Дальнем Востоке. Однако на филогенетическом дереве *VPI* дальневосточные штаммы KB-A6, выделенные в один год из одного субъекта, группировались не только с вирусами, выделенными в Китае и прочих странах Азии, но и из европейских стран и других регионов России, что свидетельствует о независимых путях заноса разных вариантов KB-A6 в ДФО, которым содействует внешняя и внутренняя миграция населения.

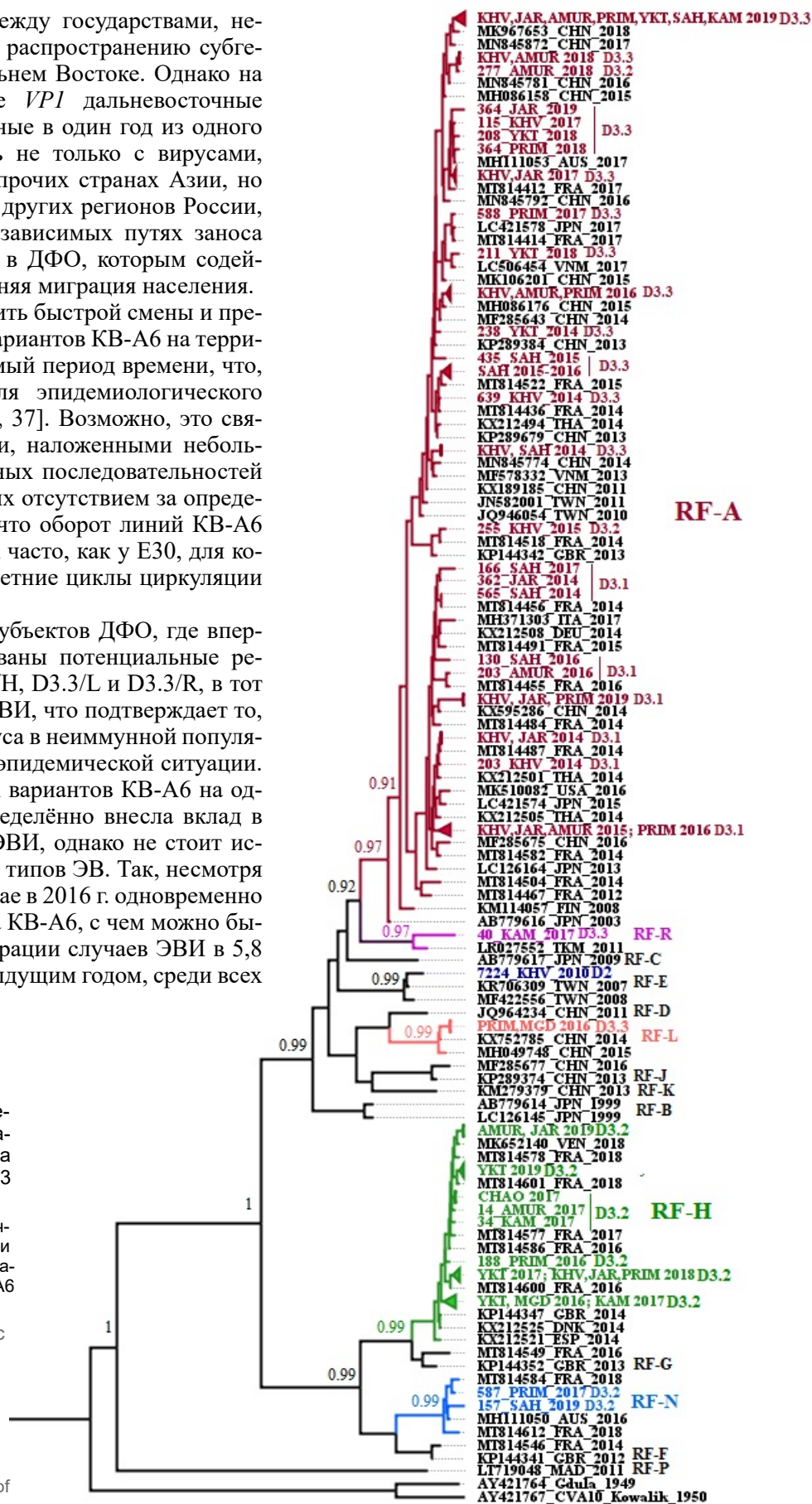
Нам не удалось выявить быстрой смены и преобладания тех или иных вариантов KB-A6 на территории ДФО в анализируемый период времени, что, например, характерно для эпидемиологического профиля ЭВ ЕСНО30 [36, 37]. Возможно, это связано как с ограничениями, наложенными небольшим количеством изученных последовательностей из каждого субъекта или их отсутствием за определённый год, так и с тем, что оборот линий KB-A6 может происходить не так часто, как у E30, для которого установлены 3–5-летние циклы циркуляции отдельных вариантов [31].

В большинстве тех субъектов ДФО, где впервые были идентифицированы потенциальные рекомбинанты D3.2/A, D3.2/H, D3.3/L и D3.3/R, в тот же год наблюдался рост ЭВИ, что подтверждает то, что появление нового вируса в неиммунной популяции вызывает ухудшение эпидемической ситуации. Коциркуляция нескольких вариантов KB-A6 на одной территории тоже определённо внесла вклад в уровень заболеваемости ЭВИ, однако не стоит исключать и влияния других типов ЭВ. Так, несмотря на то что в Приморском крае в 2016 г. одновременно циркулировали 4 варианта KB-A6, с чем можно было бы связать рост регистрации случаев ЭВИ в 5,8 раза по сравнению с предыдущим годом, среди всех

Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа фрагментов гена полимеразы *3Dpol* KB-A6 (753 н.о.).

Цветом выделены дальневосточные штаммы KB-A6. Прописными латинскими буквами справа указаны рекомбинантные формы KB-A6 (от RF-A до RF-P).

Fig. 3. The MCC phylogenetic tree constructed based on partial *3Dpol* sequences of coxsackievirus A6 (753 b.p.). Far Eastern CVA-6 strains are highlighted in color. Capital Latin letters on the right indicate recombinant forms (RF-A–RF-P) of CVA-6.



идентифицированных в этот период неполиомиелитных ЭВ преобладал Е30. В то же время в ЕАО в 2019 г. отмечены и подъём заболеваемости ЭВИ с доминированием КВ-А6 в спектре обнаруженных неполиомиелитных ЭВ, и совместная циркуляция 3 различных линий вируса. В связи с этим представляется обоснованным, что на проявления эпидемического процесса КВ-А6-инфекции в субъектах ДФО в 2014–2019 гг. всё же в достаточной мере воздействовал уровень популяционного иммунитета, на что указывает и тот факт, что основными выделителями КВ-А6 являлись дети до 3 лет.

Популяции ЭВ имеют квазивидовую структуру за счёт высокой скорости мутаций и рекомбинаций, которые являются следствием молекулярных механизмов, свойственных процессу репликации вирусной РНК [38]. Фрагменты генома ЭВ эволюционируют независимо друг от друга даже на уровне микроэволюции, обеспечивая ЭВ существование в виде всемирного высокодинамичного пула генетической информации [39, 40]. Частая и свободная перетасовка фрагментов между вирусными геномами может потенциально привести к появлению новых геновариантов ЭВ с изменёнными патогенетическими свойствами, повышенной вирулентностью и трансмиссивностью [40–42].

До 2008 г. в Европе и 2009 г. в США случаи ЭВИ, связанные с КВ-А6, регистрировались достаточно редко, а в Азии до 2009 г. КВ-А6 вызывал вспышки герпангины [12, 43, 44]. Однако события рекомбинации в геноме КВ-А6, предшествовавшие серии крупных вспышек с 2008 г., не только привели к смене основной клинической формы КВ-А6-инфекции на БКСР и появлению атипичной симптоматики этого заболевания, но и, возможно, к большей трансмиссивности вируса. Учитывая, что уже около 10 лет в мире выявляют только субгенотип D3 КВ-А6 [28, 29], эволюция и появление множественных линий вируса прежде всего связаны с рекомбинацией неструктурных областей генома.

Исследование С.Н. Wang и соавт. показало, что белок 2С может играть важную роль в патогенности штаммов КВ-А6, а генетические изменения, затрагивающие эту область, могут оказывать влияние на исходы КА6-инфекции [45]. Сопоставление клинических данных и молекулярного анализа КВ-А6, обнаруженных во время вспышки 2012–2013 гг. в Шанхае (КНР), выявило, что штаммы, относящиеся к рекомбинантной форме J, вызывали более обширное поражение кожных покровов, чем штаммы линии A [35].

В работе Е. Gaunt и соавт. показана связь между возникновением атипичной экзантемы в виде обширных герпесоподобных высыпаний, диагностированных во время вспышки БКСР в Эдинбурге (Великобритания) в 2014 г., и установленной у заболевших рекомбинантной формы Н КВ-А6 [23]. Сле-

дует отметить, что штаммы КВ-А6, идентифицированные нами при расследовании вспышки БКСР в ЧАО в 2017 г. и вызвавшие появление геморрагической сыпи у детей, также принадлежали линии Н. Эти наблюдения показывают, что события рекомбинации в неструктурных областях генома КВ-А6 могут способствовать появлению вариантов вируса, вызывающих различные клинические фенотипы и более тяжёлое течение КВ-А6-инфекции. В связи с этим выявление взаимосвязей между рекомбинацией и изменениями патогенетических свойств вируса имеет важное значение и подчёркивает необходимость дальнейшего изучения.

Учитывая генетическую изменчивость ЭВ и риск возникновения вариантов с высоким патогенным и эпидемическим потенциалом, постоянный надзор за ЭВ является обязательным инструментом, направленным на своевременное выявление и отслеживание таких штаммов, быструю оценку эпидемической ситуации и принятие адекватных управленческих решений [24]. Важность непрерывного надзора также определяется тем, что интродукция и циркуляция «нового» вируса в популяции может быть незаметной довольно длительное время, пока не появятся критические изменения в геноме, способные привести к вспышке. Так, расследование вспышки менингоэнцефалита, произошедшей среди детей в Ростове-на-Дону в 2013 г. и вызванной ЭВ А71, показало опасность скрытой циркуляции на территории России занесённого, предположительно, из Китая вируса в течение нескольких лет до её возникновения [46].

Рекомбинация играет ключевую роль в эволюции ЭВ и других представителей семейства *Picornaviridae*, обеспечивая не только их разнообразие, но и стабильное существование в качестве глобального генофонда [47]. Появление множественных геновариантов КВ-А6 свидетельствует о том, что рекомбинация является одним из важнейших механизмов адаптации вируса и сохранения его патогенности в человеческой популяции.

Планируемое продолжение исследования может помочь внести ясность в особенности молекулярной эпидемиологии КВ-А6 в отдельных субъектах ДФО. В свою очередь, полученные знания будут способствовать совершенствованию эпидемиологического надзора за ЭВИ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* 2013;14:282–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
2. Gonzalez G., Carr M.J., Kobayashi M., et al. Enterovirus-associated hand-foot and mouth disease and neurological complications in Japan and the rest of the world. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(20):5201. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20205201>

3. Repass G.L., Palmer W.C., Stancampiano F.F. Hand, foot, and mouth disease: identifying and managing an acute viral syndrome. *Cleve Clin. J. Med.* 2014;81(9):537–43. DOI: <https://doi.org/10.3949/ccjm.81a.13132>
4. Zhao T.S., Du J., Sun D.P., et al. A review and meta-analysis of the epidemiology and clinical presentation of coxsackievirus A6 causing hand-foot-mouth disease in China and global implications. *Rev. Med. Virol.* 2020;30(2):e2087. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.2087>
5. Yao X., Bian L.L., Lu W.W., et al. Enterovirus spectrum from the active surveillance of hand foot and mouth disease patients under the clinical trial of inactivated Enterovirus A71 vaccine in Jiangsu, China, 2012–2013. *J. Med. Virol.* 2015;87(12):2009–17. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24275>
6. Guo W.P., Lin X.D., Chen Y.P., et al. Fourteen types of co-circulating recombinant enterovirus were associated with hand, foot, and mouth disease in children from Wenzhou, China. *J. Clin. Virol.* 2015;70:29–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.093>
7. Pons-Salort M., Parker E.P.K., Grassly N.C. The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2015;28(5):479–87. DOI: <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000187>
8. Solomon T., Lewthwaite P., Perera D., et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* 2010;10(11):778–90. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70194-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70194-8)
9. Mao Q., Wang Y., Yao X., et al. Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014;10(2):360–7. DOI: <https://doi.org/10.4161/hv.27087>
10. Xing W., Liao Q., Viboud C., et al. Epidemiological characteristics of hand-foot-and-mouth disease in China, 2008–2012. *Lancet Infect. Dis.* 2014;14(4):308–18. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70342-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6)
11. Yang Z.Y., Chen X.Q., Sun D., Wei D. Mortality in children with severe hand, foot and mouth disease in Guangxi, China. *Indian Pediatr.* 2018; 55(2):137–9.
12. Bian L., Wang Y., Yao X., et al. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2015;13(9):1061–71. DOI: <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1058156>
13. Robinson C.R., Doane F.W., Rhodes A.J. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957 – isolation of group A Coxsackie virus. *Can. Med. Assoc. J.* 1958;79(8):615–21.
14. Nassef C., Ziemer C., Morrell D.S. Hand-foot-and-mouth disease: a new look at a classic viral rash. *Curr. Opin. Pediatr.* 2015;27(4):486–91. DOI: <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000246>
15. Kimmis B.D., Downing C., Tying S. Hand-foot-and-mouth disease caused by coxsackievirus A6 on the rise. *Cutis.* 2018;102(5):353–6.
16. No T.H., Jo K.M., Jung S.Y., et al. Coxsackievirus A6-induced hand-foot-and-mouth disease mimicking Stevens–Johnson syndrome in an immunocompetent adult. *Infect. Chemother.* 2020;52(4):634–40. DOI: <https://doi.org/10.3947/ic.2020.52.4.634>
17. Cheng F.F., Zhang B.B., Cao M.L., et al. Clinical characteristics of 68 children with atypical hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6: a single-center retrospective analysis. *Transl. Pediatr.* 2022;11(9):1502–9. DOI: <https://doi.org/10.21037/tp-22-352>
18. Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Зверев В.В. Энтеровирусы в Российской Федерации в 2014 году. В кн.: *Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции»*. Том 2. Нижний Новгород; 2015:7–10. Novikova N.A., Golitsyna L.N., Zverev V.V. Enteroviruses in the Russian Federation in 2014. In: *Newsletter «Morbidity, Etiological Structure and Issues of Prevention of Enterovirus (Non-Polio) Infection»*. Volume 2. Nizhny Novgorod; 2015:7–10. EDN: <https://elibrary.ru/xwaren>
19. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Епифанова Н.В. и др. Неполиомиелитные энтеровирусы в Российской Федерации в 2017 году. В кн.: *Информационный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции»*. Нижний Новгород; 2018;5:5–12. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Epifanova N.V., et al. Non-polio enteroviruses in the Russian Federation in 2017. In: *Newsletter «Morbidity, Etiological Structure and Issues of Prevention of Enterovirus (Non-Polio) Infection»*. Volume 5. Nizhny Novgorod; 2018;5:5–12. EDN: <https://elibrary.ru/osqjdp>
20. Сапег Е.Ю., Бутакова Л.В., Троценко О.Е. и др. Современные молекулярно-генетические технологии в изучении интенсивности эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в ряде субъектов Сибирского федерального округа Российской Федерации. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2019;(12):42–50. Sapega E.Yu., Butakova L.V., Trotsenko O.E., et al. State-of-the-art molecular genetic techniques in surveillance over intensity of enterovirus infection epidemic process in some constituent entities of the Siberian Federal district of the Russian Federation. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2019;(12):42–50. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-321-12-42-50> EDN: <https://elibrary.ru/roivaw>
21. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(8):2698–704. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06>
22. Nasri D., Bouslama L., Omar S., et al. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(8):2370–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00093-07>
23. Gaunt E., Harvala H., Österback R., et al. Genetic characterization of human coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: a potential role of recombination in emergence and pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 2015;96(Pt. 5):1067–79. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.000062>
24. Лукашев А.Н., Голицына Л.Н., Вакуленко Ю.А. и др. Современные возможности и направления развития молекулярно-эпидемиологического мониторинга в надзоре за энтеровирусными инфекциями. Опыт Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет*. 2018;8(4):452–64. Lukashov A.N., Golitsina L.N., Vakulenko Y.A., et al. Current possibilities and potential development of molecular enterovirus surveillance. Experience of Russian Federation. *Infection and Immunity*. 2018;8(4):452–64. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-4-452-464> EDN: <https://elibrary.ru/ywwjhn>
25. Muir P., Kämmerer U., Korn K., et al. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11(1):202–27. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.202>
26. Anh N.T., Nhu L.N.T., Van H.M.T., et al. Emerging coxsackievirus A6 causing hand, foot and mouth disease, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 2018;24(4):654–62. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2404.171298>
27. He Y.Q., Chen L., Xu W.B., et al. Emergence, circulation, and spatiotemporal phylogenetic analysis of coxsackievirus A6- and Coxsackievirus A10-associated hand, foot, and mouth disease infections from 2008 to 2012 in Shenzhen, China. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(11):3560–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01231-13>

28. Song Y., Zhang Y., Ji T., et al. Persistent circulation of Coxsackievirus A6 of genotype D3 in mainland of China between 2008 and 2015. *Sci. Rep.* 2017;7(1):5491. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05618-0>
29. Ngangas S.T., Bisseux M., Jugie G., et al. Coxsackievirus A6 recombinant subclades D3/A and D3/H were predominant in hand-foot-and-mouth disease outbreaks in the paediatric population, France, 2010–2018. *Viruses.* 2022;14(5):1078. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14051078>
30. Puenpa J., Saengdao N., Khanarat N., et al. Evolutionary and genetic recombination analyses of Coxsackievirus A6 variants associated with hand, foot, and mouth disease outbreaks in Thailand between 2019 and 2022. *Viruses.* 2023;15(1):73. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15010073>
31. McWilliam Leitch E.C., Bendig J., Cabrerizo M., et al. Transmission networks and population turnover of echovirus 30. *J. Virol.* 2009;83(5):2109–18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02109-08>
32. Lukashov A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., et al. Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* 2003;77:10423–31. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10423-10431.2003>
33. Lindberg M.A., Andersson P., Savolainen C., et al. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J. Gen. Virol.* 2003;84:1223–35. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.18971-0>
34. Lu J., Zeng H., Zheng H., et al. Hand, foot and mouth disease in Guangdong, China, in 2013: new trends in the continuing epidemic. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014;20(7):O442–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12468>
35. Feng X., Guan W., Guo Y., et al. A novel recombinant lineage's contribution to the outbreak of coxsackievirus A6-associated hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012–2013. *Sci. Rep.* 2015;5:11700. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep11700>
36. Lukashov A.N., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Gmyl L.V. Analysis of echovirus 30 isolates from Russia and new independent states revealing frequent recombination and reemergence of ancient lineages. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(2):665–70. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02386-06>
37. Benschop K.S.M., Broberg E.K., Hodcroft E., et al. Molecular epidemiology and evolutionary trajectory of emerging echovirus 30, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2021;27(6):1616–26. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2706.203096>
38. Domingo E., Martin V., Perales C., Escarmis C. Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008;323:3–32. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-75546-3_1
39. Lukashov A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., et al. Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* 2005;86(Pt. 12):3281–90. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81264-0>
40. Лукашев А.Н. Роль рекомбинации в эволюции энтеровирусов. *Вопросы вирусологии.* 2005;50(3):46–52. Lukashov A.N. Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Problems of Virology.* 2005;15(3):157–67. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.457> EDN: <https://elibrary.ru/hsghuv>
41. Combelas N., Holmblat B., Joffret M.L., et al. Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses.* 2011;3(8):1460–84. DOI: <https://doi.org/10.3390/v3081460>
42. Ngangas S.T., Lukashov A., Jugie G., et al. Multirecombinant enterovirus A71 subgenogroup C1 isolates associated with neurologic disease, France, 2016–2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019;25(6):1204–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2506.181460>
43. Khetsuriani N., LaMonte-Fowlkes A., Oberste M.S., Palansch M.A. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* 2006;55(8):1–20.
44. Abedi G.R., Watson J.T., Pham H., et al. Enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2009–2013. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 2015;64(34):940–3. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6434a3>
45. Wang S.H., Wang A., Liu P.P., et al. Divergent pathogenic properties of circulating Coxsackievirus A6 associated with emerging hand, foot, and mouth disease. *J. Virol.* 2018;92(11):e00303–18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00303-18>
46. Akhmadishina L.V., Govorukhina M.V., Kovalev E.V., et al. Enterovirus A71 meningoencephalitis outbreak, Rostov-on-Don, Russia, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21(8):1440–3. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2108.141084>
47. Lukashov A.N. Recombination among picornaviruses. *Rev. Med. Virol.* 2010;20(5):327–37. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.660>

Информация об авторах

Бутакова Людмила Васильевна[✉] — н.с. Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, evi.khv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>

Сапега Елена Юрьевна — к.м.н., в.н.с., рук. Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4438-6913>

Троценко Ольга Евгеньевна — д.м.н., директор Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>

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 30.12.2022;
принята к публикации 10.09.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Liudmila V. Butakova[✉] — researcher, Far Eastern regional scientific methodological center for the study of enterovirus infection, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, evi.khv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7238-3691>

Elena Yu. Sapega — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Far Eastern regional scientific methodological center for the study of enterovirus infection, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4438-6913>

Olga E. Trotsenko — D. Sci. (Med.), Director, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <https://orcid.org/0000-0003-3050-4472>.

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 30.12.2022;
accepted for publication 10.09.2023;
published 28.10.2023



Филодинамическая характеристика гена *LMP-1* вируса Эпштейна–Барр, изолированного на территории Нижегородской области

Брызгалова Д.А.¹, Сахарнов Н.А.^{1✉}, Попкова М.И.¹, Соболева Е.А.², Кулова Е.А.³, Уткин О.В.¹

¹Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

²Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия;

³ООО «Тонус Кроха и семейная стоматология», Нижний Новгород, Россия

Аннотация

Введение. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) относится к числу самых распространённых герпесвирусов и обладает выраженным генетическим полиморфизмом. Изучение филодинамических характеристик вируса является важным аспектом исследования эволюционных изменений гена *LMP-1* и их последствий.

Цель — филодинамический анализ нижегородских изолятов ВЭБ на основе С-концевого фрагмента гена *LMP-1*.

Материалы и методы. В исследование были включены 158 изолятов ВЭБ, полученных из лейкоцитов крови и слюны детей 1–17 лет с диагнозом «инфекционный мононуклеоз, вызванный ВЭБ» ($n = 68$) и условно здоровых детей сопоставимого пола и возраста ($n = 29$). Геноварианты *LMP-1* были получены с помощью метода секвенирования по Сэнгеру. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей проводили в программе «MEGA X», филодинамический анализ полученных нуклеотидных последовательностей и изолятов, депонированных в GenBank, — в пакете программ «BEAST v. 1.10.4», рекомбинационный анализ — в программе «Simplot».

Результаты. Получены и депонированы в базу данных GenBank 158 нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* нижегородских изолятов ВЭБ. Установлено время циркуляции ближайшего общего предка для модифицированных геновариантов В95-8 с мутациями *G212S + E328Q + S366T* и NC с заменой *D250N*, датированное 1994 и 1923 гг. Скорость эволюции данных геновариантов была наиболее высокой и составила $1,298 \times 10^{-4}$ и $7,868 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен/сайт/год. Выявлены рекомбинации в нижегородских последовательностях Med-, В95-8, China 1 с мутациями *G212S*, *G212S*, *E214Q* соответственно.

Заключение. Впервые дана филодинамическая характеристика нижегородских изолятов и геновариантов *LMP-1* ВЭБ, изолированных в разных регионах мира. Полученные данные расширяют существующие представления о циркуляции геновариантов *LMP-1* ВЭБ на территории европейской части России.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, секвенирование, *LMP-1*, инфекционный мононуклеоз, филодинамика, геноварианты

Этическое утверждение. У законных представителей несовершеннолетних пациентов получено добровольное информированное согласие в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной (протокол № 3 от 11.11.2021).

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: Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Попкова М.И., Соболева Е.А., Кулова Е.А., Уткин О.В. Филодинамическая характеристика гена *LMP-1* вируса Эпштейна–Барр, изолированного на территории Нижегородской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):369–379.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-379>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-379>

Phylogenetic characteristics of the *LMP-1* gene of the Epstein–Barr virus isolated in the Nizhny Novgorod region

Daria A. Bryzgalova¹, Nikolay A. Sakharnov^{1✉}, Maria I. Popkova¹, Evgeniya A. Soboleva², Ekaterina A. Kulova³, Oleg V. Utkin¹

¹Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia;

²Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhny Novgorod, Russia;

³Tonus Krokha i Semeynaya Stomatologiya LLC, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

Introduction. Epstein–Barr virus (EBV) is one of the most common herpesviruses and has a pronounced genetic polymorphism. The study of the phylogenetic characteristics of the virus is an important aspect of the study of evolutionary changes in the *LMP-1* gene and their consequences.

The **aim** of the work was a phylogenetic analysis of EBV isolates from Nizhny Novgorod region based on the C-terminal fragment of the *LMP-1* gene.

Materials and methods. The study included 158 EBV isolates obtained from blood leukocytes and saliva of children aged 1–17 years with a diagnosis of infectious mononucleosis caused by EBV ($n = 68$) and apparently healthy children of comparable sex and age ($n = 29$). *LMP-1* genovariants were obtained using the Sanger sequencing method. Comparative analysis of amino acid sequences was performed using the MEGA X program. Phylogenetic analysis of the obtained nucleotide sequences and isolates deposited in GenBank was carried out using the BEAST v. 1.10.4 software package. Recombination analysis was performed using the Simplot program.

Results. 158 nucleotide sequences of the C-terminal fragment of the *LMP-1* gene from Nizhny Novgorod region EBV isolates were obtained and deposited in the GenBank database. The circulation time of the nearest common ancestor for the modified B95-8 genovariants with *G212S + E328Q + S366T* and NC mutations with the *D250N* substitution has been established dating back to 1994 and 1923. The rate of evolution of these genovariants was the highest and amounted to 1.298×10^{-4} and 7.868×10^{-4} nucleotide substitutions/site/year. Recombinations were detected in the Nizhny Novgorod region sequences Med-, B95-8, China 1 with mutations *G212S*, *G212S*, *E214Q*, respectively.

Conclusion. For the first time, a phylogenetic characterization of Nizhny Novgorod region isolates and *LMP-1* EBV genovariants isolated in various regions of the world is given. The data obtained expand the existing understanding of the circulation of EBV *LMP-1* genovariants in the territory of the European part of Russia.

Keywords: Epstein–Barr virus, sequencing, *LMP-1*, infectious mononucleosis, phylogenetics, genovariants

Ethics approval. Voluntary informed consent was obtained from all persons representing underage patients in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (2013). The protocol of the study was approved by the local Ethics Committee of the Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Academician I.N. Blokhina" Rospotrebnadzor. (Protocol No. 3, November 11, 2021).

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: Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Popkova M.I., Soboleva E.A., Kulova E.A., Utkin O.V. Phylogenetic characteristics of the *LMP-1* gene of the Epstein–Barr virus isolated in the Nizhny Novgorod region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):369–379.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-379>

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

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является представителем семейства *Herpesviridae*, подсемейства *Gammaherpesvirinae*, рода *Lymphocryptoviruses*, вида *Human gammaherpesvirus 4*. ВЭБ характеризуется генетическим разнообразием, которое обусловлено длительной эволюцией, включающей

ряд аспектов. Показано, что рекомбинация играет определяющую роль в формировании разнообразия ВЭБ и структуры его генома [1]. Зафиксированы признаки диверсифицирующего отбора на уровне генов латентной фазы, функция которых заключается в переходе активной инфекции ВЭБ к длительной персистенции [2].

Одним из них является ген латентного мембранного белка 1 (*LMP-1*), характеризующийся наиболее высокой степенью генетической изменчивости по сравнению с другими вирусными генами. Большинство работ по изучению эволюции гена *LMP-1* выполнено зарубежными исследователями. До настоящего времени в России исследования, посвящённые эволюционным изменениям *LMP-1*, основывались на филогенетическом анализе С-концевого фрагмента гена, изолированного в популяции древних народов (славян и татар), а также референсных последовательностей геновариантов в рамках классификации R. Edwards и соавт. [3, 4]. Данная классификация является наиболее распространённой и включает 7 геновариантов *LMP-1*: *Alaskan*, *China 1*, *China 2*, *China 3*, *B95-8*, *Mediterranean (Med)* и *North Carolina (NC)* [3]. Одним из важных аспектов классификации R. Edwards и соавт. является анализ вариаций наиболее полиморфного и охарактеризованного в структурно-функциональном плане С-концевого фрагмента гена *LMP-1* [3]. Рядом исследователей были выявлены новые варианты гена *LMP-1* (вне классификации R. Edwards и соавт.), такие как *Southeast Asia 1* и *2 (SEA 1* и *SEA 2)*, изолированные в Таиланде [5], *Srb1* и *Srb2* — в Сербии [6], а российскими учёными среди взрослого населения обнаружен уникальный древний вариант *LMP1-TatK* [4]. У инфицированных лиц во время репликации ВЭБ в его геноме возникают мутации, которые приводят к генетическому разнообразию вируса [7]. Данные спонтанные замены, накопленные у взрослых инфицированных лиц, не всегда закрепляются в популяции, но могут влиять на конечный результат при оценке эволюционных изменений геновариантов *LMP-1*. Поэтому для исследования распространённости и эволюции С-концевого фрагмента гена *LMP-1* мы использовали последовательности, полученные у детей. Несмотря на значительное количество работ по изучению генетического разнообразия *LMP-1*, эволюционные изменения гена и их последствия изучены недостаточно.

В современный период широкое применение получил филодинамический анализ — метод оценки эволюции патогенов с учётом временных параметров. Основными филодинамическими параметрами являются скорость эволюции и время циркуляции ближайшего общего предка. Данный метод позволяет оценить динамику и направление эволюционных изменений различных патогенов.

Цель исследования — филодинамический анализ нижегородских изолятов ВЭБ на основе С-концевого фрагмента гена *LMP-1*.

Материалы и методы

Исследовали 158 изолятов ВЭБ, полученных из лейкоцитов крови и слюны 68 детей 1–17 лет,

госпитализированных в Детскую инфекционную больницу № 8 г. Нижнего Новгорода с диагнозом «инфекционный мононуклеоз, вызванный ВЭБ», и 29 условно здоровых детей сопоставимого пола и возраста, проходивших диспансеризацию в ООО «Тонус Кроха и семейная стоматология» (Нижний Новгород). У законных представителей несовершеннолетних пациентов получено добровольное информированное согласие в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной (протокол № 3 от 11.11.2021).

Фракцию лейкоцитов получали с помощью реагента «Гемолитик» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Пробоподготовку слюны проводили по оптимизированному нами способу, изложенному ранее [9]. Экстракцию тотальной нуклеиновой кислоты из лейкоцитов крови и слюны производили при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) с модификациями [9, 10]. Наличие вирусной ДНК ВЭБ подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с применением набора реагентов «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) на амплификаторе «Rotor-Gene Q 5plex HRM» («Qiagen»).

С-концевой фрагмент гена *LMP-1* амплифицировали с помощью разработанного нами лабораторного протокола, базирующегося на использовании метода ПЦР с праймерами, описанными в статье [11]. Одностадийный вариант ПЦР проводили, используя праймеры: A1 5'-AGT CAT AGT AGC TTA GCT GAA-3' и A2 5'-CCA TGG ACA ACG ACA CAG T-3. Размер фрагмента С-концевой области гена *LMP-1* — 602 п.н.

Секвенирование очищенных амплифицированных фрагментов ДНК проводили с помощью набора реагентов «Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems») на генетическом анализаторе «AB-3500 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems») с использованием оригинального программного обеспечения «3500 Data Collection Software v. 1.0» («Applied Biosystems»).

Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью открытого программного обеспечения «MEGA X» («Mega Software»)¹.

Формирование выборки

Для изучения разнообразия С-концевого фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ были проанализированы доступные в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности размером более 80% открытой

¹ URL: <https://www.megasoftware.net>

рамки считывания. В выборку вошли 763 нуклеотидные последовательности гена *LMP-1* и генома ВЭБ, изолированные после 1970 г. на территории Австралии, Аляски, Аргентины, Бразилии, Великобритании, Ганы, Гонконга, Индонезии, Кении, Китая, Кореи, Нигерии, Пакистана, Польши, Сербии, США, Тайваня, Таиланда, Хорватии, Швейцарии, Японии. Последовательности гена *LMP-1*, полученные другими отечественными исследователями на территории России, в указанной базе данных не представлены.

Филодинамический анализ

Выравнивание нуклеотидных последовательностей наряду с формированием аминокислотного кода *LMP-1* проводили с помощью программного обеспечения «MEGA X» [12]. Для построения филогенетического дерева использовали метод максимального правдоподобия, пакет программ «BEAST v. 1.10.4» [8]. Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей была подобрана модель Hasegawa–Kishino–Yano. На основе модели SkyGrid рассчитывали динамику демографических показателей [13]. Достоверными считали уровни апостериорной вероятности $> 0,85$. На базе строгих молекулярных часов измеряли скорость эволюции. Длина цепи Маркова Монте-Карло составила 200 млн шагов. Графическую визуализацию дерева осуществляли в программе «FigTree 1.4.3». Дендрограммы анализировали с помощью программы «Tracer v. 1.7.1» [14].

По данным российских авторов, одним из типов генетической изменчивости, которые способствуют эволюции гена *LMP-1*, являются точечные мутации [4]. В связи с этим нами проведён сравнительный анализ точечных аминокислотных замен в последовательностях исследуемой выборки с целью определения специфических мутаций, характерных для определённых регионов, а также отслеживания их распространения со временем.

Рекомбинационный анализ

Предполагаемые рекомбинантные последовательности анализировали с помощью программного обеспечения «Simplot» [15] по методу попарного внутригруппового невзвешенного среднего (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) с длиной окна 200 п.н., шаг 20 п.н. и 100 повторениями bootstrap-анализа. Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали модель TN93 (Tamura–Nei, 93).

Результаты

На первом этапе работы нами получены и депонированы в базу данных GenBank 158 нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* нижегородских изолятов ВЭБ (реги-

ональные номера OP105219–OP105376 присвоены 09.08.2022).

Филогенетический анализ

Для оценки кластеризации нижегородских изолятов ВЭБ, а также характера их взаимоотношений с последовательностями, изолированными в 1970–2022 гг. в различных регионах мира, было сконструировано филогенетическое дерево (рис. 1).

Только один идентифицированный нами нижегородский изолят (OP105219) образовывал единый кластер и показал высокую вероятность филогеографической связи (значение апостериорной вероятности, равной 0,99) с референсной последовательностью *Alaskan* и последовательностями, полученными в Аргентине. Общую группу также образовывали изоляты *China 1*, полученные из Нижегородской области, Сербии и Китая. Однако значительного генетического сходства между ними не выявлено в связи с низкими значениями апостериорной вероятности. Похожая апостериорная вероятность отмечалась и в кластере с нижегородскими изолятами B95-8. Эта группа включала наибольшее количество последовательностей, выделенных в различных регионах мира (Сербии, Аргентине, Великобритании, Швейцарии, Бразилии, Австралии и США). Генетическое родство с апостериорной вероятностью 0,87 с последовательностями из Сербии показали нижегородские изоляты ВЭБ и геновариант *NC*, сформировав на дереве единую монофилетическую группу. Нижегородские последовательности *Med* не образовывали отдельного единого кластера, а распределились между генетически близкими изолятами из Бразилии и Швейцарии.

Скорость эволюции

Скорость эволюции С-концевого фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ в кластерах, содержащих нижегородские изоляты *China 1* и *Alaskan*, варьировала незначительно и составила $5,042 \times 10^{-5}$ и $1,518 \times 10^{-5}$ нуклеотидных замен/сайт/год. В кластерах с последовательностями из Нижегородской области *NC* и *B95-8* скорость эволюции была несколько выше — $1,298 \times 10^{-4}$ и $7,868 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен/сайт/год. Для всей исследуемой выборки С-концевого фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ скорость эволюции составила $2,32 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен/сайт/год.

Время циркуляции ближайшего общего предка

Клада, содержащая нижегородские изоляты B95-8 и последовательности из Сербии, Аргентины, Великобритании, Швейцарии, Бразилии, Австралии и США, включала общую комбинацию мутаций *G212S + E328Q + S366T*. Нами было определено время циркуляции ближайшего общего предка для данного геноварианта B95-8 с заменами *G212S + E328Q + S366T*, которое датируется 1994 г. Клада,

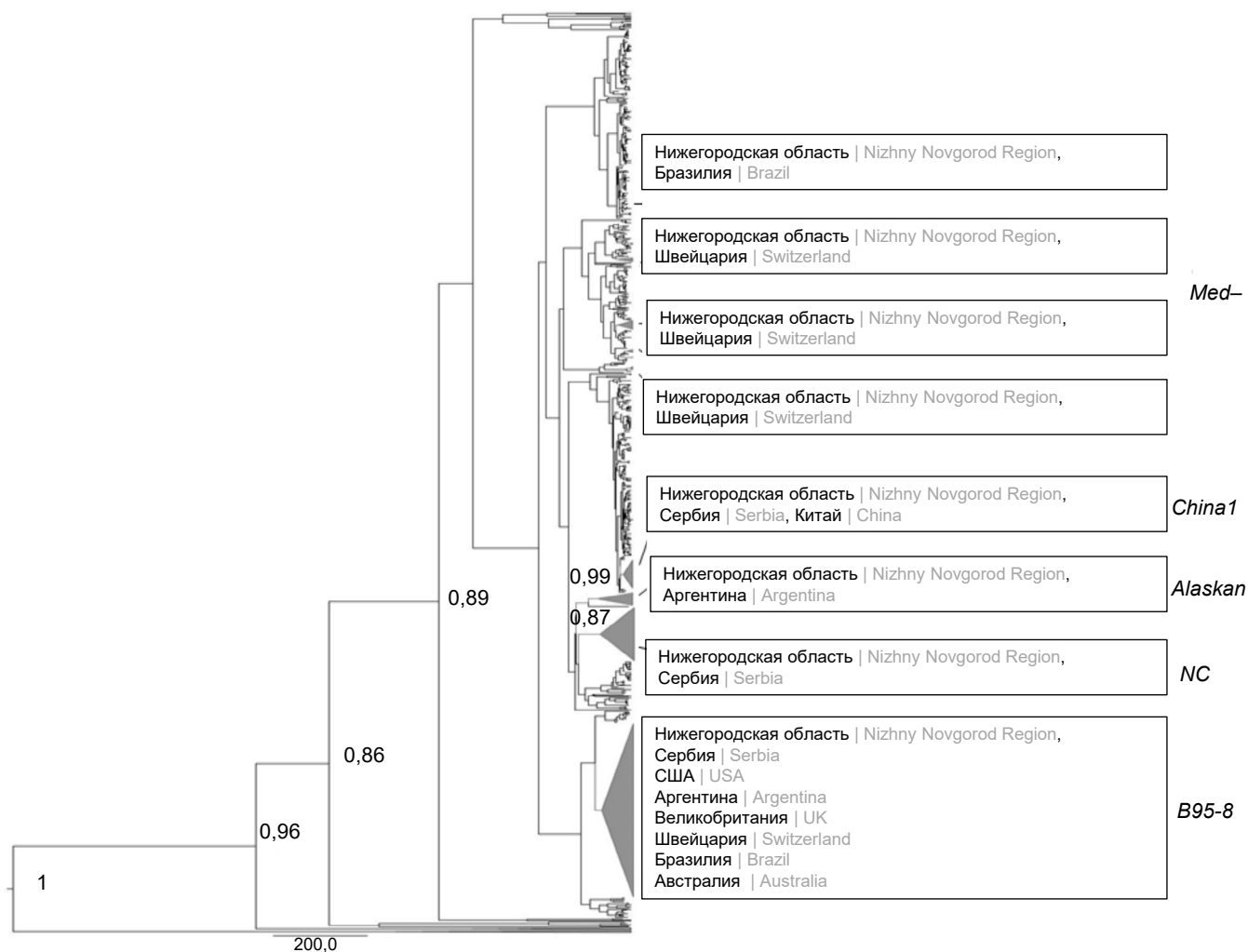


Рис. 1. Байесово филогенетическое дерево MCC, сконструированное на основе нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* нижегородских изолятов ВЭБ и последовательностей, полученных в различных регионах мира и доступных в GenBank.

MCC — филогенетическое дерево с максимальной надёжностью клада. Показаны байесовские апостериорные вероятности более 0,85 в основных узлах. Треугольниками обозначены клады с нижегородскими изолятами ВЭБ и соседними последовательностями, доступными в GenBank.

Fig. 1. Bayesian MCC phylogenetic tree constructed on the basis of the nucleotide sequences of the C-terminal fragment of the *LMP-1* gene of Nizhny Novgorod region EBV isolates and sequences obtained in various regions of the world and available in GenBank.

MCC is a phylogenetic tree with maximum clade reliability. Shown are Bayesian posterior probabilities greater than 0.85 at the major nodes. Triangles indicate clades with EBV isolates from Nizhny Novgorod region and neighboring sequences available in GenBank.

содержащая нижегородские изоляты *NC* и последовательности из Сербии, включает общую замену *D250N* и предположительно имеет общего предка, время циркуляции ближайшего общего предка — 1923 г.

Сравнительный анализ аминокислот

На следующем этапе работы нами проведён сравнительный анализ данных точечных аминокислотных замен в последовательностях, доступных в GenBank и выделенных в различных географических регионах мира. Также производился поиск других общих аминокислотных мутаций в последовательностях геновариантов *Med*, *China 1*, *Alaskan*.

Анализ включал изоляты ВЭБ, ранее охарактеризованные по классификации R. Edwards и соавт. в других исследованиях [6, 16–22]. Масштабные исследования, посвящённые данному вопросу, проводились только на территориях Аргентины, Бразилии, Сербии, Китая, Швейцарии, Америки.

Сравнительный анализ точечных аминокислотных замен в последовательностях исследуемой выборки продемонстрировал высокую распространённость мутаций, не характерных для определённых геновариантов (таблица).

Самая малочисленная группа, состоящая из 11 последовательностей, принадлежала геноварианту *LMP-1 Alaskan*, который редко встречается во

Сравнение частоты распространения геновариантов *LMP-1* ВЭБ в мире
Comparison of the prevalence of EBV *LMP-1* genovariants in the world

Регион Region	B95-8		<i>Med</i> (G212S)	<i>NC</i> (D250N)	<i>China 1</i> (E214Q)
	G212S + E328Q + S366T	G212S + E328Q			
Нижегородская область Nizhny Novgorod Region	99 % (95/96)	–	78% (7/9)	96% (27/28)	50% (12/24)
Сербия Serbia	–	100% (23/23)	77% (14/18)	100% (10/10)	–
США USA	80% (8/10)	–	–	–	–
Бразилия Brazil	50 % (3/6)	–	70% (19/27)	–	–
Аргентина Argentina	87% (7/8)	–	94% (34/36)	–	79% (23/29)
Иран Iran	–	100% (4/4)	59% (13/22)	–	–
Швейцария Switzerland	75% (3/4)	–	–	–	–

всём мире. Проанализированные изоляты не выявили общих аминокислотных замен, помимо мутаций, охарактеризованных R. Edwards и соавт. [3].

Для геноварианта *NC* была характерна мутация *D250N*, которая встречалась только в изолятах из Нижегородской области и Сербии в 94,4–100% случаев соответственно. Как видно из таблицы, наиболее широко распространёнными в различных регионах мира были мутации *G212S + E328Q + S366T* в изолятах *B95-8* (50–99%) и *G212S* в *Med* (59–94%).

Ещё одной мутацией, обнаруженной в нашем исследовании, является *E214Q*, которая была характерна для геноварианта *China 1* и встречалась в нижегородских изолятах и в последовательностях из Аргентины с частотой 46 и 79% соответственно (таблица). Мы предполагаем, что мутация *E214Q* появилась в нижегородских изолятах *China 1* в результате их рекомбинации с последовательностью штамма *Raji*. По аналогии мутация *G212S* появилась в изолятах *Med* и *B95-8* в результате их рекомбинации с последовательностью *CAO*, т.к. данная замена характерна для данного штамма. Похожая ситуация прослеживается и для мутации *S366T* в *B95-8*. В связи с этим нами был проведён рекомбинационный анализ данных мутаций при помощи бутскан-анализа.

Рекомбинационный анализ

Для определения возможных событий рекомбинации все нижегородские последовательности *B95-8* с заменами *G212S + S366T* тестировали в сравнении с референсными последовательностями *CAO* и *B95-8*. Референсная последовательность *Alaskan* использовалась в качестве внешней группы. Точка рекомбинации (R1) была обнаружена во всех последовательностях в домене *CTAR1* (192–232 а.к.), ответственного за активацию транскрипционного фактора NF-κB (рис. 2, а) [23]. Этот результат указывает на то, что мутация *G212S* в изолятах *B95-8* действительно могла появиться в процессе рекомбинации между последовательностями *B95-8* и *CAO*.

Мы также проанализировали все нижегородские последовательности, расположенные в одном кластере вместе с *China 1* и содержащие мутацию *E214Q*, которая характерна для штамма *Raji*. При тестировании против референсных последовательностей *Raji*, *China 1* и *CAO*, вариант *China 1* с мутацией *E214Q* показал точку рекомбинации (R2) в области домена *CTAR1* (192–232 а.к.) во всех последовательностях (рис. 2, б). Таким образом, можно говорить о том, что мутация *E214Q* в нижегородских изолятах *China 1* появилась в результате рекомбинации последовательностей *China 1* и *Raji*.

В дальнейшем нами проведён рекомбинационный анализ всех нижегородских последовательностей, которые образовали кладу вместе с *Med*– и содержали мутацию *G212S*, характерную для штамма *CAO*. В качестве внешней группы была включена последовательность *B95-8*. На рис. 2, в видна общая область (R3) пересечения всех нижегородских последовательностей *Med*– с мутацией *G212S* и *CAO* в домене *CTAR1* (192–232 а.к.). В связи с этим мутация *G212S* в нижегородских последовательностях *Med*– могла появиться вследствие рекомбинации *Med*– и *CAO*.

Обсуждение

В настоящей работе впервые дана филогенетическая характеристика нижегородских изолятов ВЭБ, полученных от детей с диагнозом «инфекционный мононуклеоз, вызванный ВЭБ» и здоровых доноров, и геновариантов *LMP-1* ВЭБ, изолированных в различных регионах мира. Для оценки эволюционных взаимоотношений между последовательностями С-концевого фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ в исследуемой выборке мы реконструировали филогенетическое дерево с применением байесовской статистики. Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* показал, что нижегородские изоляты, относящиеся к геноварианту *NC*, генетически близки с последовательностями из Сербии. Это можно объяснить активными миграционными

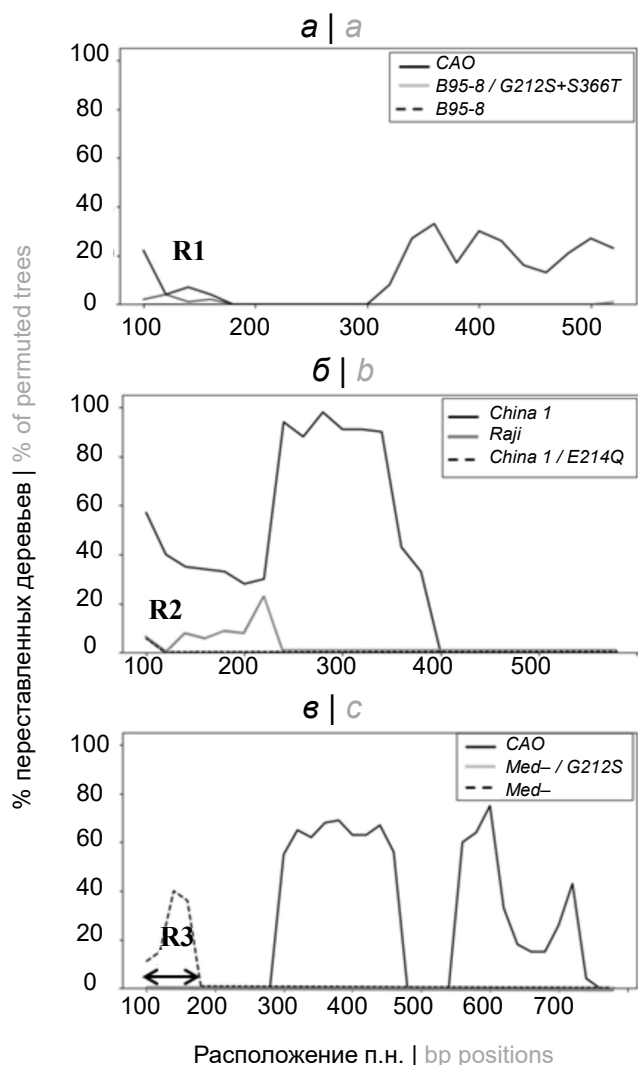


Рис. 2. Рекомбинационный анализ нижегородских последовательностей.

а — бутскан-анализ нижегородских последовательностей *B95-8* с мутациями *G212S + S366T* относительно референсных последовательностей *CAO*, *B95-8* и *Alaskan* (внешняя группа); **б** — бутскан-анализ нижегородских последовательностей с мутацией *E214Q* относительно последовательностей *Raji*, *China 1* и *CAO* (внешняя группа); **в** — бутскан-анализ нижегородских последовательностей *Med-* с мутацией *G212S* относительно последовательностей *Med-*, *CAO* и *B95-8* (внешняя группа). Параметры анализа: окно 200 п.н., шаг 20 п.н. и 100 повторений по методу UPGMA.

Fig. 2. Recombinant analysis of Nizhny Novgorod region sequences.

a — bootscan analysis of Nizhny Novgorod region sequences in *B95-8* with *G212S + S366T* mutations relative to sequences *CAO*, *B95-8* and *Alaskan* (outer group); **b** — bootscan analysis of Nizhny Novgorod region sequences with *E214Q* mutation relative to the sequences *Raji*, *China 1* and *CAO* (outer group); **c** — bootscan analysis of Nizhny Novgorod region *Med-* sequences with *G212S* mutation relative to *Med-*, *CAO* and *B95-8* sequences (outer group). Analysis parameters: window 200 bp, step 20 bp and 100 repetitions according to the UPGMA method.

процессами, происходящими вследствие исторически сложившихся межгосударственных взаимоотношений данных стран. Сравнительный анализ аминокислотных замен нижегородских изолятов и

последовательностей из Сербии, отнесённых к геноварианту *NC*, продемонстрировал наличие общей мутации *D250N* для данных регионов. Время происхождения ближайшего общего предка для геноварианта *NC* с наличием мутации *D250N* изолятов из Сербии и Нижегородской области датируется 1923 г., что соотносится с периодом русской эмиграции во время гражданской войны в Королевство Югославию, в которую входили Сербия, Хорватия и Словения. Больше всего русских переселенцев было размещено в Сербии, где насчитывалось около 200 колоний [24]. В настоящий момент функциональная значимость замены *D250N* для геноварианта *NC* не определена.

Особый интерес для нас представляла клада, содержащая нижегородские последовательности *B95-8* и изоляты, полученные из Сербии, Аргентины, Великобритании, Швейцарии, Бразилии, Австралии и США. Несмотря на то что апостериорная вероятность для данной клады была невысокой, почти все последовательности включали комбинацию из 3 аминокислотных замен *G212S + S366T + E328Q* и были изолированы после 1999 г. Исключение составляли изоляты из Сербии, в которых сравнение комбинации мутаций *G212S + S366T + E328Q* было невозможным из-за методических ограничений, т.к. данные последовательности, размещённые в GenBank, не содержали исследуемый отрезок с заменой *S366T*. Стоит обратить внимание на то, что время происхождения общего ближайшего предка для клады *B95-8* с мутациями *G212S + S366T + E328Q* датируется 1994 г. Проведённый нами сравнительный анализ точечных аминокислотных мутаций *G212S + S366T + E328Q* геноварианта *B95-8* показал их высокую распространённость в последовательностях, полученных в различных регионах мира после 1999 г. Отметим, что высокая распространённость модифицированного варианта *B95-8* с заменами *G212S + S366T + E328Q* не связана с определёнными территориями, а встречается с высокой частотой в последовательностях, изолированных в различных регионах мира. Модифицированный вариант *B95-8* с мутациями *G212S + S366T + E328Q* преобладал в Бразилии, Аргентине, Иране. Похожая картина наблюдалась в последовательностях из Ирана, в которых мутации *G212S + E328Q* в изолятах *B95-8* были широко распространены, а замена *S366T* не учитывалась. Данные последовательности не были депонированы в GenBank, и расчёт был произведён на основе материалов статьи В. Sarshari и соавт. [22]. Распространённость геноварианта *B95-8* на данных территориях была невысокой по сравнению с другими геновариантами *LMP-1*. Другая картина представлена в Евразии, где *B95-8* является часто встречающимся геновариантом в большинстве стран. При анализе имеющихся последовательностей в GenBank выявлено,

что совокупность мутаций *G212S + E328Q* была характерна для всех изолятов из Сербии, относящихся к *B95-8*. Примечательно, что мутация *E328Q*, по данным российских авторов, не типична для европейских образцов, а широко распространена среди населения Дальнего Востока России [25]. В нижегородских изолятах мутации *G212S + S366T + E328Q* встречались в абсолютном большинстве последовательностей *B95-8*. Мы полагаем, что после 1999 г. в мире произошла смена циркуляции прототипного геноварианта *B95-8* на модифицированный вариант с мутациями *G212S + E328Q + S366T*. Наши предположения подтверждаются и отсутствием информации о данных мутациях в геноварианте *B95-8* в одном из масштабных исследований 1999 г. [3]. Нами также было показано, что замена *G212S* в модифицированном геноварианте *B95-8* является результатом рекомбинации с последовательностью *CAO*.

Широкое распространение последовательностей *B95-8* с мутациями *G212S + S366T + E328Q* может быть связано с тенденцией к росту числа заболеваний, ассоциированных с ВЭБ. По данным российских авторов, рост заболеваемости инфекционным мононуклеозом наблюдается как в целом по России, так и в Нижегородской области [26]. Растёт число случаев, требующих госпитализации [27].

Данная тенденция может быть связана с влиянием замен *G212S + S366T + E328Q* на функциональную активность белка LMP-1. Замены *G212S* и *S366T* ассоциированы с геновариантом *LMP-1 CAO*. Известно, что геновариант *CAO* обладает большей трансформационной активностью, чем геновариант *B95-8* [25]. Существуют исследования, сосредоточенные на изучении влияния мутаций *G212S + S366T* на функциональную активность геноварианта *B95-8* в клеточных линиях. Так, в работе отечественных авторов было показано, что геновариант *B95-8* с заменами *G212S + S366T* усиливает активацию транскрипционного фактора NF-κB, который играет важную роль в регуляции ключевых функций клетки, таких как рост и выживаемость, старение и опухолевая трансформация [23]. В другой работе показано, что штамм *B95-8* при наличии мутации *G212S + S366T* демонстрировал сниженную или утраченную способность активировать микроРНК (miR-155 и miR-193b), которые играют важную роль в различных физиологических и патологических процессах [28]. Влияние комбинации мутаций *G212S + E328Q + S366T* на функциональную активность белка LMP-1 *B95-8* ещё предстоит изучить.

Интересно, что оба геноварианта *B95-8* с мутациями *G212S + E328Q + S366T* и *NC* с заменой *D250N* имели скорость эволюции выше, чем у остальных геновариантов. Данный факт может объяснять высокую распространённость геновариантов *B95-8* с мутациями *G212S + E328Q + S366T* и *NC* с заменой *D250N* в определённых регионах ми-

ра. Нами были получены данные, характеризующие скорость эволюции для всей исследуемой выборки С-концевого фрагмента гена *LMP-1* ВЭБ. Скорость эволюции $2,32 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен/сайт/год была несколько выше по сравнению со значениями, полученными для гена *LMP-1* другими исследователями из Аргентины и Бразилии ($8,591 \times 10^{-5}$ и $3,8 \times 10^{-5}$ замен/сайт/год соответственно). Это может быть связано с тем, что итоговые результаты скорости эволюции определяются размером выборки и её составом.

Отметим, что по результатам нашего исследования геноварианты *B95-8*, а также *Med-/Med+*, несущие аминокислотную замену *G212S*, и *China 1* с мутацией *E214Q* отличались наличием рекомбинации с другими штаммами и геновариантами вируса и характеризовались тенденцией к широкому распространению в популяции, что может в дальнейшем оказывать влияние на эволюцию гена *LMP-1*. В связи с этим остановимся на характеристике указанных мутаций.

Геноварианты *Med-* и *Med+* с заменой *G212S* чаще обнаруживали в последовательностях, полученных из разных регионов мира, изолированных после 1999 г. С высокой частотой данная мутация встречалась в изолятах *Med*, выделенных на территории Аргентины, Бразилии, Сербии, Ирана, а также в исследованных нами изолятах. Полученные нами результаты рекомбинационного анализа указывают на то, что мутация *G212S* также могла возникнуть в геноварианте *Med-* в результате рекомбинации с последовательностью штамма *CAO*. На филогенетическом дереве нижегородские изоляты *Med-* не образовывали единой клады. Это связано с тем, что данный геновариант относится к высокодивергентным.

Ранее в российских исследованиях распространённость мутаций *G212S*, *S366T*, *E328Q* не соотносили с определёнными геновариантами классификации R. Edwards и соавт. [25, 29].

Менее распространённой была мутация *E214Q*, характерная для геноварианта *China 1*. Ранее замена *E214Q* была охарактеризована в отношении аргентинского геноварианта *China 1** и встречалась независимо от групп исследования в 79% (23/29) изолятов [20]. Мутацию *E214Q* M. Gantuz и соавт. описывали как результат рекомбинации между аргентинским геновариантом *China 1** и штаммом *Raji*, содержащим эту замену в референсной последовательности, и утверждали, что высокая распространённость *China 1** может быть обусловлена генетическими и/или иммунологическими факторами [20]. Мутация *E214Q* встречалась также в нижегородских изолятах *China 1* в 50% (12/24) изолятов. В исследованиях других российских авторов, проведённых ранее, данные о распространённости мутации *E214Q* в изолятах *China 1* отсутствуют.

Проведённый нами рекомбинационный анализ показал, что мутация *E214Q* в нижегородских изолятах *China 1* появилась в результате рекомбинации со штаммом *Raji*. Мутация *E214Q* расположена в DSGxxS — каноническом мотиве (HOS-сайт). Этот сайт входит в состав E3-лигазы, которая участвует в процессинге молекулы IкВ, являющейся супрессором NF-κB [25]. Функциональная значимость замены *E214Q* для геноварианта *China 1* требует дальнейшего изучения.

Таким образом, анализ аминокислотных последовательностей *LMP-1* геновариантов *B95-8*, *NC*, *Med* и *China 1*, полученных в различных регионах мира, выявил ряд специфических мутаций, которые при определённых условиях (снижении иммунитета, воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды) могут оказывать влияние на развитие и характер течения ВЭБ-ассоциированных заболеваний, в том числе инфекционного мононуклеоза.

Наше исследование, а также работа М. Gantuz и соавт. [20] позволяют взглянуть с другой стороны на утверждение о том, что С-концевая область гена изменялась без какой-либо истории рекомбинации по сравнению с N-концом и трансмембранной областью *LMP-1*, о чём упоминалось ранее в работе J.M. Wittgows и соавт. [30]. Появление большого разнообразия новых мутаций, специфичных для определённых геновариантов, может быть следствием рекомбинации, что подчёркивает важность этого механизма для возникновения новых вариантов вируса.

Заключение

Впервые в России нами проведён филогенетический анализ последовательностей С-концевой области гена *LMP-1* ВЭБ, изолированных у детей с инфекционным мононуклеозом и здоровых вирусоносителей.

Показано, что скорость эволюции нижегородских изолятов *B95-8* с набором мутаций *G212S* + *E328Q* + *S366T* и изолятов *NC* с мутацией *D250N* была выше по сравнению с описанными ранее в других регионах мира, также для них было определено время циркуляции общего предка (1994 и 1923 гг. соответственно).

Среди нижегородских изолятов выявлено преобладание последовательностей, содержащих штамм-неспецифичные аминокислотные замены *G212S* (в геновариантах *B95-8* и *Med*) и *E214Q* (в геноварианте *China 1*). При этом они характеризовались наличием рекомбинаций с другими штаммами, что может в перспективе способствовать формированию новых ветвей эволюции гена *LMP-1*.

Выявленные нами молекулярно-генетические характеристики изолятов *LMP-1* отражают особенности эволюции ВЭБ в Нижегородской области

(относится к европейской части России) и формирования его генетического разнообразия. При этом отмечается направленность эволюции гена *LMP-1* в сторону увеличения частоты мутаций, ассоциированных с повышенной трансформирующей активностью вируса.

Полученные результаты являются основой для перспективных исследований фенотипических свойств выявленных мутаций *LMP-1*, оценки их клинической значимости и взаимосвязи с особенностями эпидемического процесса ВЭБ-инфекции.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Agwati E.O., Oduor C.I., Ayieko C., et al. Profiling genome-wide recombination in Epstein–Barr virus reveals type-specific patterns and associations with endemic-Burkitt lymphoma. *Viral J.* 2022;19(1):208. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01942-8>
2. McGeoch D.J., Davison A.J., Dolan A., et al. Molecular evolution of the Herpesvirales. In: Domingo E., Parrish C.R., Holland E., ed. *Origin and Evolution of Viruses*. Academic Press;2008:447–75. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374153-0.00020-5>
3. Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology.* 1999;261(1):79–95. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>
4. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К. и др. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты. *Вопросы вирусологии.* 2020;65(2):77–86. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., et al. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. *Problems of Virology.* 2020;65(2):77–86. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86> EDN: <https://elibrary.ru/ojdshq>
5. Smatti M.K., Al-Sadeq D.W., Ali N.H., et al. Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of *LMP-1* oncogene among healthy population: an update. *Front. Oncol.* 2018;8:211. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>
6. Banko A.V., Lazarevic I.B., et al. Characterization of the variability of Epstein–Barr virus genes in nasopharyngeal biopsies: potential predictors for carcinoma progression. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153498. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153498>
7. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., et al. Genome diversity of Epstein–Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.* 2015;89(10):5222–37. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03614-14>
8. Suchard M.A., Lemey P., Baele G., et al. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey016. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
9. Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А. и др. Методические подходы к дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в слюне. *Инфекция и иммунитет.* 2022;12(3):461–74. Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., et al. Methodological approaches to differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B in saliva. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2022;12(3):461–74. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-MAT-1807> EDN: <https://elibrary.ru/hcmagz>
10. Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А. и др. Методические основы дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В. *Инфекция и иммунитет.*

- 2021;11(6):1057–66. Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., et al. Methodological basics for differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(6):1057–66.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-MBF-1661>
EDN: <https://elibrary.ru/lcwjrx>
11. Smatti M.K., Yassine H.M., AbuOdeh R., et al. Prevalence and molecular profiling of Epstein–Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189033.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189033>
 12. Kumar S., Stecher G., Li M., et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547–9.
DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 13. Hill V., Baele G. Bayesian estimation of past population dynamics in BEAST 1.10 using the Skygrid coalescent model. *Mol. Biol. Evol.* 2019;36(11):2620–8.
DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msz172>
 14. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 2018;67(5):901–4.
DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy03>
 15. Lole K.S., Bollinger R.C., Paranjape R.S., et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 1999;73(1):152–60.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.152-160.1999>
 16. Banko A., Lazarevic I., Cupic M., et al. Carboxy-terminal sequence variation of *LMP1* gene in Epstein–Barr-virus-associated mononucleosis and tumors from Serbian patients. *J. Med. Virol.* 2012;84(4):632–42.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.23217>
 17. Zuercher E., Buttica C., Wyniger J., et al. Genetic diversity of EBV-encoded *LMP1* in the Swiss HIV cohort study and implication for NF- κ B activation. *PLoS One*. 2012;7(2):e32168.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032168>
 18. Lorenzetti M.A., Gantuz M., Altcheh J., et al. Distinctive Epstein–Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: *LMP1* sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(3):609–18.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.05778-11>
 19. Renzette N., Somasundaran M., Brewster F., et al. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 genetic variability in peripheral blood B cells and oropharyngeal fluids. *J. Virol.* 2014;88(7):3744–55.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03378-13>
 20. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein–Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174221.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174221>
 21. Alves P., Larrate M., Garcia-Costa A., et al. Spatial dispersal of Epstein–Barr virus in South America reveals an African American variant in Brazilian lymphomas. *Viruses*. 2022;14(8):1762.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v14081762>
 22. Sarshari B., Mohebbi S.R., Ravanshad M., et al. Sequence variations of Epstein–Barr virus *LMP1* gene in gastric cancer and chronic gastritis isolates from Iranian patients. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.* 2022;15(3):225–31.
DOI: <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v15i3.2578>
 23. Дидук С.В., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. Роль функционально значимых мутаций гена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр в активации клеточных сигнальных путей. *Биохимия*. 2008;73(10):1414–21. Diduk S.V., Smirnova K.V., Pavlish O.A., Gurtsevitch V.E. Functionally significant mutations in the Epstein–Barr virus *LMP1* gene and their role in activation of cell signaling pathways. *Biochemistry*. 2008;73(10):1414–21. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297908100106>
EDN: <https://elibrary.ru/juuyyn>
 24. Косик В.И. *Русская эмиграция в Сербии XX–XXI вв.* М.; 2022. Kosik V.I. *Russian Emigration in Serbia of the XX–XXI Centuries*. Moscow; 2022.
 25. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017;22(5):239–47. Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevitch V.E. Polymorphism of Epstein–Barr virus *LMP1* oncogene in Nanaians, representatives of indigenous minority of the Russian Far East. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2017;22(5):239–47.
DOI: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247>
EDN: <https://elibrary.ru/ykxqmo>
 26. Попкова М.И., Уткин О.В. Особенности эпидемического процесса инфекционного мононуклеоза в нижегородской области в современный период. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2021;(4):79–86. Popkova M.I., Utkin O.V. Features of the current epidemic process of infectious mononucleosis in the Nizhny Novgorod region. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2021;(4):79–86.
DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-337-4-79-86>
EDN: <https://elibrary.ru/hjuztc>
 27. Devkota K., He M., Liu M.Y., et al. Increasing Epstein–Barr virus infection in Chinese children: A single institutional based retrospective study. *F1000Res*. 2018;7:1211.
DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.15544.2>
 28. Hatton O., Smith M.M., Alexander M., et al. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 regulates host B cell MicroRNA-155 and its target FOXO3a via PI3K p110 α activation. *Front. Microbiol.* 2019;10:2692.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02692>
 29. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В. и др. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. *Вопросы вирусологии*. 2015;60(2):11–7. Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V., et al. Epstein–Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the *LMP1* gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. *Problems of Virology*. 2015;60(2):11–7.
EDN: <https://elibrary.ru/trmsfn>
 30. Burrows J.M., Bromham L., Woolfit M., et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein–Barr virus-encoded oncogene *LMP1* in virus isolates from Southeast Asia. *J. Virol.* 2004;78(13):7131–7.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004>

Информация об авторах

Брызгалова Дарья Алексеевна — м.н.с. лаб. молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6663-8440>

Сахарнов Николай Александрович[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, saharnov@nniem.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3965-2033>

Попкова Мария Игоревна — к.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5864-5862>

Соболева Евгения Андреевна — врач-инфекционист Нижегородского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3591-9618>

Кулова Екатерина Александровна — к.м.н., врач-инфекционист, аллерголог-иммунолог ООО «Тонус Кроха и семейная стоматология», Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5207-1164>

Уткин Олег Владимирович — к.б.н., зав. лаб. молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7571-525X>

Участие авторов: *Брызгалова Д.А.*, *Сахарнов Н.А.* — написание текста; *Соболева Е.А.*, *Кулова Е.А.* — представление клинического материала, формирование групп исследования; *Уткин О.В.*, *Попкова М.И.* — редактирование. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.06.2023;
принята к публикации 15.09.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Daria A. Bryzgalova — junior researcher, Laboratory of molecular biology and biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6663-8440>

Nikolay A. Sakharnov[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular biology and biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, saharnov@nniem.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3965-2033>

Maria I. Popkova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular biology and biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5864-5862>

Evgeniya A. Soboleva — infectious disease physician, Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3591-9618>

Ekaterina A. Kulova — Cand. Sci. (Med.), infectious disease physician, allergologist and immunologist, Tonus Krokha i Semeynaya Stomatologiya LLC, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5207-1164>

Oleg V. Utkin — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular biology and biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7571-525X>

Author contribution: *Bryzgalova D.A.*, *Sakharnov N.A.* — writing a text; *Soboleva E.A.*, *Kulova E.A.* — presentation of clinical material, formation of study groups; *Utkin O.V.*, *Popkova M.I.* — correction of the article. All authors made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 05.06.2023;
accepted for publication 15.09.2023;
published 28.10.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-417>

Molecular-genetic portrait of virulence of *Stenotrophomonas maltophilia*

Vladimir M. Mikhailovich¹, Rustam N. Heydarov¹, Julia A. Bocharova², Igor V. Chebotar^{2✉}¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia;²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Stenotrophomonas maltophilia* is an opportunistic pathogen that is intrinsically resistant to a wide range of antibiotics. The bacterium is associated with a number of serious diseases and makes a significant contribution to the pathogenesis of polymicrobial infections. *S. maltophilia* has a wide range of virulence factors, information about which is currently presented in the form of scattered and unconsolidated data.

Purposes and objectives: critically analyze and summarize current data regarding the molecular-genetic aspects of *S. maltophilia* virulence for better understanding of the pathogenesis of infections associated with this pathogen.

Materials and methods. An analysis of information from 80 modern literary sources devoted to the study of the virulent properties of *S. maltophilia* at the molecular-genetic level has been carried out. The analysis focuses on the mechanisms of production of virulence factors and their genetic determinants.

Results. The molecular mechanisms of virulence that determine the infectious process caused by *S. maltophilia* have been analyzed and summarized, including the adhesive function of the surface structures of the bacterial cell (lipopolysaccharides, pili/fimbriae, flagella), the production of extracellular enzymes, the ability to form biofilms on abiotic surfaces and on the tissues of the macroorganism, the functioning of efflux pumps, secretion of small molecules into the external environment by the intercellular information exchange system Quorum Sensing, as well as the influence of iron metabolism on the virulence properties of *S. maltophilia*.

Conclusion. The adaptation mechanisms that allow *S. maltophilia* to adapt to new habitat niches and survive in the human body and unfavorable environmental conditions have been poorly studied. An analytical review summarizing current information on the molecular-genetic aspects of *S. maltophilia* virulence will be of interest to clinicians and researchers studying the fundamental mechanisms of virulence.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*, virulence factors, adhesins, biofilms, Quorum Sensing

Funding source. The work has been carried out with financial support from the Ministry of Health of the Russian Federation under the State Assignment "Molecular-genetic mechanisms of the emergence and loss of antibiotic bacterial resistance in current opportunistic pathogens" (Number in the Integrated state information system for recording research, development and technological work for civil purposes (EGISU NIOKTR No.) 121060200152-8).

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

For citation: Mikhailovich V.M., Heydarov R.N., Bocharova J.A., Chebotar I.V. Molecular-genetic portrait of virulence of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):380–390.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-417>EDN: <https://www.elibrary.ru/uvszan>

Молекулярно-генетический портрет вирулентности *Stenotrophomonas maltophilia*

Михайлович В.М.¹, Гейдаров Р.Н.¹, Бочарова Ю.А.², Чеботарь И.В.^{2✉}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия;

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Stenotrophomonas maltophilia* является условно-патогенным микроорганизмом, обладающим природной устойчивостью к широкому спектру антибиотиков. Бактерия ассоциирована с рядом серьёзных заболеваний и вносит значимый вклад в патогенез полимикробных инфекций. *S. maltophilia* обладает широким набором факторов вирулентности, информация о которых к настоящему времени представлена в виде разрозненных и необобщённых данных.

Цели и задачи: критически проанализировать и обобщить актуальные данные, затрагивающие молекулярно-генетические аспекты вирулентности *S. maltophilia*, для более глубокого понимания патогенеза инфекций, связанных с этим возбудителем.

Материалы и методы. Выполнен анализ информации из 80 современных литературных источников, посвящённых изучению вирулентных свойств *S. maltophilia* на молекулярно-генетическом уровне. Анализ сфокусирован на механизмах продукции факторов вирулентности и определяющих их генетических детерминантах.

Результаты. Проанализированы и обобщены молекулярные механизмы вирулентности, детерминирующие вызванный *S. maltophilia* инфекционный процесс, включая адгезивную функцию поверхностных структур бактериальной клетки (липополисахариды, пили/фимбрии, флагеллы), продукцию внеклеточных энзимов, способность формировать биоплёнки на абиотических поверхностях и на тканях макроорганизма, функционирование эффлюкс-помп, секрецию во внешнюю среду малых молекул системой межклеточного обмена информацией Quorum Sensing, а также влияние метаболизма железа на вирулентные свойства *S. maltophilia*.

Заключение. Адаптационные механизмы, позволяющие *S. maltophilia* приспосабливаться к новым нишам обитания, выживать в организме человека и неблагоприятных условиях окружающей среды, изучены недостаточно. Аналитический обзор, обобщающий актуальные сведения о молекулярно-генетических аспектах вирулентности *S. maltophilia*, будет интересен клиническим специалистам и исследователям, изучающим фундаментальные механизмы вирулентности.

Ключевые слова: *Stenotrophomonas maltophilia*, факторы вирулентности, адгезины, биоплёнки, Quorum Sensing

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации по Государственному заданию «Молекулярно-генетические механизмы возникновения и утраты антибиотикорезистентности у актуальных оппортунистических патогенов» (ЕГИСУ НИОКТР № 121060200152-8).

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

Для цитирования: Михайлович В.М., Гейдаров Р.Н., Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В. Молекулярно-генетический портрет вирулентности *Stenotrophomonas maltophilia*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023;100(5):380–390. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-417> EDN: <https://www.eiibrary.ru/uvszan>

Introduction

Stenotrophomonas maltophilia is a gram-negative microorganism that is widespread in nature and is often isolated from water sources, soil, and plant and animal samples [1]. According to the Bergey's Manual¹, the ge-

nus *Stenotrophomonas* includes three species. Modern alternative taxonomic resources attribute to this genus at least 19 species, which demonstrate a wide variety of metabolic pathways, as well as genetic and phenotypic heterogeneity both within the genus and between strains of each individual species [2–4].

S. maltophilia is well adapted to exist in a variety of habitats, including environments with a low content of nutrient substrates, is capable of utilizing a wide

¹ Palleroni N.J. *Stenotrophomonas* // Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01237>

range of carbon sources (including trichlorethylene, gasoline, chloroform), and is naturally resistant to salts of heavy metals [5, 6].

S. maltophilia is an opportunistic agent that is intrinsically multidrug resistant to a wide range of antibiotics. The microorganism is associated with a number of serious diseases and is isolated in respiratory and urological infections, bacteremia, endocarditis, etc. [7]. The bacterium is also of interest as an active member of polymicrobial bacterial communities, which affects the metabolism of surrounding microorganisms, including through antagonistic suppression of representatives of other species (interspecific antagonism). A notable example of such a community is observed in cystic fibrosis, where *S. maltophilia* colonizes the respiratory tract of patients and often coexists with *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cenocepacia*, nontuberculous mycobacteria, etc. [8, 9].

The pathogenetic basis of the bacterium is determined by virulence factors — molecular structures that ensure the development of the infectious process. *S. maltophilia* has a fairly wide range of virulence factors (or factors potentially associated with virulence), which include the surface structures of the bacterial cell (lipopolysaccharides (LPS), pili/fimbriae and flagella), the production of extracellular enzymes (in particular, proteases, elastases, lipases, DNases and RNases, fibrinolysin), the ability to form biofilms on abiotic surfaces and on tissues of the macroorganism and secrete small molecules into the external environment through QS (quorum sensing) systems called “diffusible signal factor” — DSF) [6, 11].

Adhesins as a virulence factor

The key stage of the initial microorganism-host interaction is adhesion, i.e. the attachment of a bacterium to the cells of the macroorganism's tissue. Already at the adhesion phase, bacteria initiate their own biochemical processes aimed at proliferation, invasion, secretion of toxins and activation of response signaling cascades of host cells.

Bacterial adhesion factors (adhesins) are represented by proteins and LPS. Protein adhesins are divided into fimbrial and afimbrial. Lipopolysaccharide and polysaccharide adhesins are associated with the cell membrane (cell wall, outer membrane and capsule). It should be noted that the functions of LPS in pathogenesis are not limited to the primary “bacterium-macroorganism” interaction: their significant role remains at subsequent stages of the infectious process.

LPS (endotoxin) of *S. maltophilia* consists of lipid A, core oligosaccharide, and O-antigen (O-polysaccharide) [12, 13]. Lipid A in LPS is a potential inducer of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production by macrophages, as demonstrated by V.J. Waters et al. in a mouse model [14]. Despite the relatively low invasive-

ness of *S. maltophilia*, the level of TNF- α after stimulation of the RAW macrophage cell line with purified lipid A of *S. maltophilia* was significantly higher than the level obtained when stimulated with lipid A isolated from the reference strain *P. aeruginosa* PAO1 [14]. Core oligosaccharides play an important role in the formation of LPS structure and, consequently, virulence. It has been established for many microorganisms that defective forms of core oligosaccharides lead to a significant decrease in virulence or the emergence of avirulent strains, for example, *P. aeruginosa* [15] and *Bordetella bronchiseptica* [16]. An equally important contribution to the formation of virulence is made by O-antigens, the complete loss of which or the presence of defects in their structure due to impaired biosynthesis can reduce virulence of the microorganism, which has been demonstrated, in particular, in species *Burkholderia pseudomallei* [17], *P. aeruginosa* [15], *Brucella abortus* [18]. LPS from different *S. maltophilia* strains are highly heterogeneous: at least 31 O-antigen variants are known [19].

A number of genes are involved in the processes of sugar metabolism and their incorporation into LPS in *S. maltophilia*. The *spgM* gene, encoding the bifunctional enzyme phosphoglucomutase/phosphomannomutase, is similar to the *algC* gene responsible for the synthesis of alginate in *P. aeruginosa* [13, 20]. Two operons play an important role in the biosynthesis of O-antigen: *rmlBACD* and *xanAB*. T.P. Huang et al., having performed SDS-PAGE analysis of purified LPS from *S. maltophilia* strains with mutations in the *rmlA*, *rmlC* and *xanB* genes, found that these genes are directly involved in the control of O-antigen biosynthesis, and the *xanB* gene is also involved in the synthesis of the core component of LPS [21]. The authors showed that both operons also influence the synthesis of exopolysaccharides produced by *S. maltophilia*, which are key components of biofilms.

In addition to surface LPS, flagella are involved in the adhesion stage. *S. maltophilia* has from one to several flagella located at the pole(s) of the bacterial cell, which, in particular, contribute to the primary attachment to the cells of the tracheal mucosa of mice and induce a specific immune response of the macroorganism [22, 23]. When BALB/c mice were infected with purified flagellin *S. maltophilia*, an increased level of cytokines was recorded in the animals after 4 hours: interleukins (IL)-1 β , -10 and TNF- α . The number of neutrophils, leukocytes and monocytes also increased, which increased nonspecific protection of mice against both *S. maltophilia* and *Staphylococcus aureus* [24].

A. Pompilio et al. compared the severity of the disease in mice after aerosol infection with a wild strain of *S. maltophilia* SM111 and a mutant variant (Δ *fliI*) lacking flagella. The authors found no statistically significant differences in animal weight loss, lung tissue damage, or mortality rates, although TNF- α values

were higher in animals infected with the wild strain. Finally, the authors made a peculiar assumption that the presence of flagella (and therefore motility) may not be associated with the virulent properties of *S. maltophilia* in the pathogenesis of lung diseases [25]. It is hypothetically possible that during a chronic infection, a microorganism lacking such a significant immunogenic factor as flagellin will have advantages by reducing the host's immune response from patients with cystic fibrosis, which, in particular, was observed in non-flagella-producing strains of *P. aeruginosa* [26]. However, most studies indicate a positive correlation between motility and primary adhesion, e.g. [22, 23, 27]. Apparently, the above-mentioned assumption about the absence of a relation between the presence of flagella and the virulent properties of *S. maltophilia* can only apply to later, chronic stages of infection, when the stages of adhesion of the microorganism preceding the disease have already been completed.

The motility of *S. maltophilia* and the level of flagellin expression depend on environmental factors and are controlled by a complex and incompletely understood genetic system. It has long been established that cyclic diguanosine monophosphate (c-di-GMP), an important signaling molecule (second messenger) that controls the physiology of the microorganism, its motility and the process of biofilm formation, is involved in the regulation of expression [28]. High c-di-GMP concentration in the cell is associated with decreased motility [29].

The intracellular concentration of c-di-GMP is regulated by changes in the activity of two classes of enzymes: diguanylate cyclases and phosphodiesterases. The former synthesize c-di-GMP from 2 molecules of guanosine triphosphate, and phosphodiesterases hydrolyze c-di-GMP to linear diguanosine monophosphate or guanosine monophosphate (GMP) [30–32].

For a number of microorganisms, some genetic determinants are known, the so-called master regulators and their homologues, which initiate and regulate the expression of flagellin genes, for example, *FlrA* (*FleQ*) in *P. aeruginosa* and *Vibrio cholera*, *flaK* and *flaM* in *Vibrio parahaemolyticus* [33–36]. For *S. maltophilia*, the mechanisms by which c-di-GMP controls the synthesis and number of flagella remain poorly understood, and only a few studies are devoted to the fundamental aspects of their functioning.

In 2014, J. Yang et al. found that the regulation of the expression of flagellar genes in *S. maltophilia* is carried out by the master regulator *FleQ* (*Smlt2295*) homologous with *P. aeruginosa* [37]. This transcription factor (enhancer-binding protein), acting in complex with the putative ATPase *FleN*, is inhibited by binding to c-di-GMP, which in turn leads to a decrease in flagellar gene expression and promotes the initiation of biofilm formation. In the absence of c-di-GMP, i.e. in the unbound state, the situation is reversed: *FleQ* promotes

increased expression of flagellins and, accordingly, reduces the ability to “sedentary” way of vital activity in biofilms.

W. Liu et al. have demonstrated a correlation between increased expression of the *BsmR* gene (regulatory protein, phosphodiesterase with an EAL-binding domain) and increased motility, as well as decreased aggregation ability in the *S. maltophilia* strain CGMCC 1.1788 [38]. Thus, *BsmR* acts as a negative regulator of biofilm formation. The *BsmR* operon controls the expression of at least 349 genes, 34 of which are involved in flagellin synthesis under the positive regulation of the transcription factor *FsnR*, which initiates transcription by binding to the promoter regions of two operons: *Smlt2303* and *Smlt2318* [39, 40].

In 2022, X. Zhang et al. analyzed genes potentially affecting c-di-GMP levels in *S. maltophilia*, namely those encoding proteins containing the GGDEF, EAL and HD-GYP domains [41]. The authors found 33 genes with the desired sequences in the genome of the microorganism and constructed mutant strains with inactivated genes. 13 out of the 33 mutant strains had reduced motility, indicating the potential role of the corresponding genes in its regulation. In addition, as a result of the analysis of diguanylate cyclases and phosphodiesterases, the authors identified a new Fe²⁺-dependent phosphodiesterase *SisP*, which, with an increase in the concentration of iron cations, increased its enzymatic activity in direct proportion, i.e. hydrolyzed c-di-GMP in a dose-dependent manner.

Type I fimbriae (SMF-1) play the role of adhesins, ensuring the attachment of *S. maltophilia* to epithelial cells. In particular, adhesion to biotic and abiotic surfaces has been shown to be inhibited in the presence of anti-SMF-1 antibodies [42]. Fimbriae are also involved in haemagglutination and biofilm formation and [42] the administration of fimbriin to BALB/c mice stimulated the production of IL-1 β , TNF- α and an increase in phagocyte activity in them [43]. It should be noted that, in contrast to clinical isolates, *S. maltophilia* strains isolated from the environment lacked such fimbriae [44], which suggests their significant role in adhesion/colonization of the respiratory tract in patients with cystic fibrosis. The production of fimbriae in *S. maltophilia* is controlled by the operon *Smlt0706–Smlt0709* [45]. Although the amino acid sequences of fimbriin in *S. maltophilia* are similar to those of pathogenic *E. coli* strains, the N-terminal region of the SMF-1 protein in *S. maltophilia* differs significantly from other bacterial families (50–61% agreement), which suggests a fairly strong phylogenetic distance of this species [42].

Type IV pili also play an important role in the adhesion of *S. maltophilia* to biotic and abiotic surfaces, including the biofilm formation [46]. Despite the fact that type IV pili are considered by many authors as an important virulence factor, no significant correlations between virulence and the presence of the *pil* gene

family associated with pili formation were found in *S. maltophilia*. The phenomenon of the formation of more massive biofilms in strains with increased motility was described by A. Pompilio et al., but this phenomenon was observed in a small sample of strains isolated from sputum samples of patients with cystic fibrosis [5]. Of the 9 strains studied that were not motile, only 2 did not form biofilms. The authors concluded that motility was not a necessary factor influencing the ability to form biofilms. At the same time, *S. maltophilia* strains isolated from other diseases had an increased ability to form biofilms in comparison with isolates from patients with cystic fibrosis. Obviously, it should be clarified here that many authors mean by motility both “swimming activity” and “twitching” of the bacterial cell.

Secretion systems and extracellular enzymes

Clinical strains of *S. maltophilia* produce siderophores, proteases (StmPr1-4), lipases (including phospholipases C and D), nucleases, gelatinase, elastase, fibrolysin/streptokinase, esterases, hyaluronidases, hemolysin and cytotoxins, which act as virulence factors and promote colonization and persistence of the microorganism, participating in adhesion, damage and destruction of host cells, capture of iron ions necessary for bacterial reproduction [47, 48].

Based on genome sequencing data, of the 9 known bacterial secretion systems, systems of types I, II, IV, V and VI were found in *S. maltophilia* [45, 49, 50]. While the role of secretion systems in the formation of virulence is well known for many microorganisms, it was described in sufficient detail for *S. maltophilia* only for systems of types II (Xps type II) and IV.

The clinical strain of *S. maltophilia* K279a has a T2SS system (*gsp* and *xps* genes), through which at least 7 proteins are secreted, including three serine proteases StmPr1-3, which cause a cytotoxic effect in lung epithelial cells, degradation of fibronectin, fibrinogen and IL-8 [51, 52]. The StmPr4 protease produced by *S. maltophilia* is also known, but its functional role has not been clarified yet [53, 54].

S. maltophilia produces 13 potential antibacterial effector proteins. At the same time, the nucleotide sequences encoding them are highly conserved for different strains of *S. maltophilia* [55]. These effectors are produced by the type IV secretion system (T4SS), which is found in both strains isolated from natural sources and clinical isolates of *S. maltophilia* [56]. This system, called VirB/D4 T4SS, is similar to T4SS in bacteria of the closest genus, Xanthomonas, and is encoded by the chromosomal genes *virB1-virB11* and *virD4*. Effector proteins are secreted by the T4SS system into the environment or by direct contact immediately into a competing bacterial cell, thereby realizing interspecific antagonism.

The interspecific antagonism inherent in *S. maltophilia* was elegantly described by M.Y. Nas et al. [56].

The authors showed that *S. maltophilia* strains, using T4SS, caused the death of the natural isolate of *P. aeruginosa* 7700, *P. aeruginosa* PAO1 and *P. aeruginosa* PAK strains. Interestingly, *S. maltophilia* also affects some other species of the genus *Pseudomonas*, but very selectively. For example, *S. maltophilia* kills *P. mendocina*, but not *P. fluorescens*, *P. putida* or *P. stutzeri*.

It is noteworthy that from the above-mentioned 13 antibacterial effectors of *S. maltophilia*, two potential proteins were isolated — RS14245 and RS14255, which have bactericidal properties against representatives of the genera *Pseudomonas* and *Escherichia*. The effectors RS14245 and RS14255, neutralized using blocking proteins, when added to the medium, did not lead to the death of laboratory and clinical strains of *P. aeruginosa* and *E. coli*. Mutant strains lacking these proteins or the T4SS system had significantly reduced bactericidal properties [55].

The data obtained are interesting from various points of view. On the one hand, the secretion of effectors that suppress other bacterial species is a significant factor that increases the virulence of *S. maltophilia*; on the other hand, the isolation and study of such effectors can potentially be used to create new antimicrobial therapeutics for targeted therapy of infections caused by *Pseudomonas* and *Escherichia*.

It should be noted that the T4SS system is used by *S. maltophilia* not only for competitive interspecific inhibition. The products of this system also perform other important functions — they inhibit the apoptosis in host epithelial cells and initiate it in macrophages [56].

Biofilms

During the biofilm formation, the primary adhesion (weak reversible attachment) of planktonic counterparts of *S. maltophilia* occurs within 30–60 minutes. The second stage develops after 4 hours, at which the microorganism is firmly attached to the surface with the participation of semi-flexible fimbriae, flagella filaments and surface LPS. The attached cells begin to produce exopolysaccharides, forming the extracellular matrix, and after approximately 10 hours they form the first surface microcolonies. After 18–24 hours, the process enters the third stage, at which cell differentiation occurs in the maturing biofilms, microchannels are formed for the transport of water, salts, nutrients and the exchange of communication signaling molecules (QS), which will be discussed below. At the last stage, mature biofilms gradually “bud off” planktonic counterparts of bacteria, which, due to their inherent motility, begin to spread and colonize new niches [20].

In 2020, L. Ramos-Hegazy et al., having analyzed the library of mutant transposons they had created, identified the *GpmA* gene encoding phosphoglycerate mutase, a glycolytic enzyme potentially involved in the initial stages of biofilm formation both on polystyrene and on human bronchial epithelial cell lines [57].

S. maltophilia strains with the knocked out *GpmA* gene had a significantly reduced rate of biofilm formation in the first hours compared to the wild-type strain. Interestingly, after 6 hours, the difference in the rate of biofilm formation in the wild and mutant strains was completely leveled, which suggests the participation of the *GpmA* gene as a mediator at the initial stages of adhesion and biofilm formation [57, 58].

A. Pompilio et al. analyzed 85 strains isolated from both cystic fibrosis patients and other infections. The vast majority of all strains (88.2%) formed biofilms in the plate test. At the same time, strains associated with cystic fibrosis demonstrated lower optical density of biofilms, but had greater multiple resistance in comparison with “non-cystic fibrosis” strains [59]. It is likely that enhanced biofilm formation may serve as a protective survival mechanism specifically for susceptible microorganisms.

The analysis of transcriptomic profiles of cells from biofilms (in comparison with planktonic counterparts) showed that only a relatively small proportion of genes are involved in the transition to existence in biofilms: the expression level decreases in 1–3% of genes and increases in 6–9% of genes [60]. Nevertheless, the analysis of the available information on the role of numerous virulence factors leads to the conclusion that the transition of cells from the planktonic lifestyle to the “sedentary” one in biofilms is initiated by many mechanisms that require further study.

Efflux pumps as virulence factors

As a rule, the efflux pumps are considered to be among the mechanisms that provide microorganisms with resistance to antimicrobial therapeutics. In the meantime, the functions of some types of efflux pumps are broader — they go beyond the scope defined by the term “antibiotic bacterial resistance” and are involved in the molecular mechanisms of the formation of virulence properties.

The efflux pumps contribute significantly to the natural resistance of *S. maltophilia* to antimicrobial therapeutics. Pumps of various types found in bacteria remove a wide range of therapeutics: fluoroquinolones, tetracycline and doxorubicin under the control of the *SmrA* pump; aminoglycosides, macrolides and polymyxins — through the *MacABCsm* pump belonging to the same family of ABC (from ATP-binding cassette) pumps [61].

The *EmrCABsm* pump from the MFS (major facilitator superfamily) transporter superfamily is responsible for the removal of nalidixic acid, erythromycin, carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone and tetrachlorosalicylanilide [62]. *FusA* (ABC type) removes fusaric acid [63]. In addition, *S. maltophilia* has 8 types of RND-type pumps (*Sme**), for 7 of which (except *SmeMN*) their role in the formation of antibiotic bacterial resistance has already been established. In addition

to the antimicrobial therapeutics listed above, they are also involved in the transport of sulfamethoxazole, chloramphenicol, trimethoprim and trimethoprim-sulfamethoxazole [64].

It is interesting to note that, besides the known (and currently considered the main) function of removing xenobiotics from the bacterial cell, the efflux pumps *SmeYZ* and *MacABCsm* also influence the formation of flagella, the motility of *S. maltophilia* and the formation of biofilms. At the same time, *MacABCsm* differs from homologous pumps of other microorganisms. In particular, the expression of its operon is constitutive, of an “innate” nature, and the pump has its own original outer membrane protein *MacCsm*. In addition, in comparison with the homologous *MacAB-TolC* pump from *E. coli*, it has, as already noted, an expanded spectrum of excreted antibiotics, including macrolides, aminoglycosides and polymyxins [61].

Another noteworthy function of the efflux pumps was described by C.J. Wu et al., who showed that the *SmeYZ*, *SmeDEF* and *SbiAB* pumps influenced the secretion of the siderophore stenobactin and the utilization of iron ions [65].

For some microorganisms, the role of the efflux pumps, in particular, their outer membrane structures — porins, in increasing the invasive properties of bacteria [66] and protecting the latter from phagocytosis [67], has been demonstrated, but such information has not been published for *S. maltophilia*.

Newly obtained data indicate that our current understanding of the main function of the efflux pumps, which is limited only to the removal of xenobiotics from the cell, is not an absolute dogma and requires critical revision and further study.

Relationship between virulence factors and iron availability

Iron is a vital element for the normal metabolism of non-glucose-fermenting gram-negative bacteria, including *S. maltophilia*. Competition for iron between bacteria and the host cells in chronic infections can negatively affect the host cells. The capture of iron by bacteria can be accompanied by both local tissue damage and systemic damage, for example, severe anemia. Therefore, systems that ensure the capture and transport of iron into the bacterial cell are considered to be significant virulence factors [68].

Siderophore- and heme-mediated transport systems of iron ions into the bacterial cell were found in *S. maltophilia*. The *entAFDBEC* operon encodes the synthesis of the siderophore enterobactin, which belongs to the class of catecholamines, binding and transporting Fe^{3+} into the bacterial cell. The heme-mediated system is under the control of the *hgbBC* and probably *hmuRSTUV* operons [69].

It is very interesting that the iron capture system is not only a virulence factor itself, but can also in-

duce the activity of other mechanisms responsible for virulence properties. This occurs when there is a deficiency of iron in the environment. For example, the microorganism becomes more virulent in lung tissue in the presence of human iron-binding proteins (transferrin, lactoferrin) in the microenvironment, which reduce the level of free iron in the environment [70, 71]. In particular, under iron deficiency, the reference strain *S. maltophilia* K279a produced an increased amount of exopolysaccharides, DSF signaling molecules and formed thicker and more massive biofilms [69, 71]. It has been established that the iron supply system Fur and the transcriptional regulator σ -factor are involved in the regulation of this metabolic change, and the microorganism's response to oxidative stress and the secretion of extracellular enzymes potentially depend on the bioavailability of iron [69, 71].

System Quorum Sensing

Like most gram-negative bacteria, *S. maltophilia* (in particular, reference strain K279a) has a QS system — unique signaling mechanism for intercellular bacterial information exchange [72]. The system is in charge of the production of extracellular signaling molecules called autoinducers, their detection and response (changes in the expression of certain genes) to the emergence of signaling molecules in the environment. Autoinducers accumulate in the environment, and when a certain threshold concentration is reached, the surrounding bacterial cells are able to detect them. Through this exchange of signaling molecules, cells regulate their metabolic mechanisms responsible for colonization and virulence, including changes in motility, biofilm formation, production of extracellular effectors and resistance properties [73, 74].

T.P. Huang et al. found that the main molecule in the QS system of *S. maltophilia* is the autoinducer DSF, which is *cis*- Δ^2 -11-methyl-lauric acid, a monobasic saturated fatty acid, the synthesis of which is regulated by the *rpfF* and *rpfB* (from regulation of pathogenicity factors) genes [72]. The *rpf* gene cluster, a regulator of virulence factors, is responsible for the synthesis of own DSF and recognition of “foreign” signaling molecules, for which two variants are known: *rpf1* and *rpf2*, dividing the entire population of *S. maltophilia* into pheno- and genotypically different subpopulations [74]. The *rpf* cluster encodes the synthesis of RpfF synthase and the two-component RpfC/RpfG system, which are responsible for the detection and transduction of DSF. In its active form, RpfG phosphodiesterase hydrolyzes c-di-GMP to linear GMP, thereby regulating the expression of a number of virulence genes [75]. It should be noted here that only strains with the *rpf-1* gene variant are initially able to produce DSF in detectable quantities without an external stimulus and, therefore, control the biofilm formation, as well as the motility and virulence of surrounding bacteria [74, 76]. In strains with

rpf-2, the N-terminal (sensory) end of RpfF synthase is shortened. It is assumed that such strains with a reduced sensor domain require preliminary activation from the outside (for example, under the influence of DSF from other bacteria or from *S. maltophilia* strains with the *rpf-1* system) to produce their own signaling molecules (DSF) into the environment [76].

It is interesting to note that strains carrying the *rpf-2* gene variant (particularly genogroups C) exhibited greater levels of resistance to colistin and increased virulence against *Galleria mellonella* wax moth larvae, which are used as one of the models for assessing virulence. Apparently, this is due to the increased ability of *rpf-2* strains to form biofilms [77]. At the same time, another model for determining virulence, which uses the *Caenorhabditis elegans* nematode, did not reveal such an association [77]. Genotyping and identification of the *rpf* variant are useful and important tools for epidemiological monitoring, which should take into account that *S. maltophilia* strains can potentially exchange *rpf* clusters through recombination during horizontal transfer of genes [76].

It has been found that *S. maltophilia* has a two-component signal transduction system called BfmA–BfmK (Smlt4209–Smlt4208). The BfmA transcription factor included in the system binds to the *bfmA–bfmK* promoter region and *Smlt0800* (*acoT*), a gene encoding acyl-coenzyme A thioesterase, which is associated with biofilm formation [40].

Unlike *P. aeruginosa*, no full-fledged canonical LuxI/LuxR QS system based on signaling molecules of acyl-homoserine lactones has been found in *S. maltophilia*. However, R. Martínez et al., having performed a comparative analysis of genomes, showed that *S. maltophilia* has a gene *Smlt1839*, similar to the LuxR regulator, encoding the SmoR regulator (*Stenotrophomonas maltophilia* orphan regulator), which *in vitro* bound the synthetic lactone oxo-C8- HSL, a natural analogue of which is synthesized by *P. aeruginosa*. The addition of pooled supernatant of the medium on which *P. aeruginosa*, which produces lactones, was cultivated, gave an impetus to increased motility of *S. maltophilia* on Petri dishes [78]. In other words, despite the absence of the canonical LuxI/LuxR system, its own homologous intercellular exchange systems allow *S. maltophilia* to recognize QS-signaling molecules of other species with the LuxI/LuxR system. It is hypothetically possible that these systems are associated with the T4SS and, under certain conditions, can initiate the secretion of effectors aimed at inhibiting the growth of competitors (see above).

When considering the DSF system in *S. maltophilia*, it is worth mentioning the phenomenon of secretion through outer membrane vesicles [79]. Vesicles are small nanostructures secreted by bacteria that are capable of transporting nucleic acids, proteins and other small molecules, such as β -lactamases. S. Devos et

al. found that the secretion of these vesicles was dramatically increased by *S. maltophilia* in the presence of imipenem [80]. The composition of the detected molecules carried in them is also interesting: these were two types of beta-lactamases encoded by chromosomes, outer membrane proteins and flagellins Smlt0387 and Smlt0184. These flagellins are homologues of Ax21, a protein that influences motility and biofilm formation in *Xanthomonas oryzae*. The functional role of this protein for *S. maltophilia* has not been established yet, but it is assumed that its secretion is initiated by DSF. The system of secretion through vesicles is classified as a potential virulence factor based on data that it affects the motility and biofilm formation of *X. oryzae* [81].

Conclusion

In the last decade, close attention has been paid to the study of the mechanisms of virulence of *S. maltophilia*. The natural multidrug resistance of the microorganism, its rapid adaptation to unfavorable environmental conditions and to new habitat niches, the graceful switching of metabolic processes by the bacterium — all this is of considerable interest both to specialists studying the fundamental mechanisms of virulence and to clinical researchers.

When discussing the virulent properties of *S. maltophilia*, it is necessary to take into account that this bacterium is characterized by pronounced intraspecific variability: strains isolated in one hospital and even from one patient can belong to fairly distant phylogenetic groups and have different phenotypes [4]. The rapid accumulation of adaptive mutations arising under the influence of the selective pressure of hospital conditions or the host cells, and horizontal transfer of genes are considered as probable reasons for such heterogeneity. Understanding the molecular processes that ensure rapid adaptation and, accordingly, survival of the microorganism in unfavorable conditions, will allow detecting potential targets for the development of new antibacterial therapeutics, as well as better understanding interspecific interactions in polymicrobial infections and establishing mechanisms of switching metabolic pathways during the transition of opportunistic pathogens from “natural” lifestyle to infectious intervention.

In this review, we have briefly presented current data on the molecular aspects of *S. maltophilia* virulence factors, without addressing the mechanisms of antibiotic bacterial resistance for the sake of brevity. We hope that the review article will be of interest to molecular biologists, clinical microbiologists and biochemists.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Gröschel M.I., Meehan C.J., Barilar I., et al. The phylogenetic landscape and nosocomial spread of the multidrug-resistant opportunist *Stenotrophomonas maltophilia*. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2044. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15123-0>
2. Ryan R.P., Monchy S., Cardinale M., et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009;7(7):514–25. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
3. Turrientes M.C., Baquero M.R., Sánchez M.B., et al. Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76(6):1746–58. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02817-09>
4. Pompilio A., Crocetta V., Ghosh D., et al. *Stenotrophomonas maltophilia* phenotypic and genotypic diversity during a 10-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Front. Microbiol.* 2016;7:1551. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01551>
5. Pompilio A., Pomponio S., Crocetta V., et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol.* 2011;11:159. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-159>
6. Trifonova A., Strateva T. *Stenotrophomonas maltophilia* — a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infect. Dis. (Lond.)*. 2019;51(3):168–78. DOI: <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1531145>
7. Brooke J.S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012;25(1):2–41. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
8. Goss C.H., Mayer-Hamblett N., Aitken M.L., et al. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2004;59(11):955–9. DOI: <https://doi.org/10.1136/thx.2003.017707>
9. Coutinho H., Falcão-Silva V.S., Gonçalves G. Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *Int. Arch. Med.* 2008;1(1):24. DOI: <https://doi.org/10.1186/1755-7682-1-24>
10. Looney W.J. Role of *Stenotrophomonas maltophilia* in hospital-acquired infection. *Br. J. Biomed. Sci.* 2005;62(3):145–54. DOI: <https://doi.org/10.1080/09674845.2005.11732702>
11. Brooke J. Advances in the microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021;34(3):e0003019. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00030-19>
12. Neal D.J., Wilkinson S.G. Lipopolysaccharides from *Pseudomonas maltophilia* structural studies of the side-chain, core, and lipid-a regions of the lipopolysaccharide from strain NCTC 10257. *Eur. J. Biochem.* 1982;128(1):143–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06944.x>
13. McKay G.A., Woods D.E., MacDonald K.L., Poole K. Role of phosphoglucosyltransferase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. *Infect. Immun.* 2003;71(6):3068–75. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3068-3075.2003>
14. Waters V.J., Gómez M.I., Soong G., et al. Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect. Immun.* 2007;75(4):1698–703. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.01469-06>
15. Goldberg J.B., Coyne M.J., Neely A.N., Holder I.A. Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* algC mutant in a burned-mouse model of infection. *Infect. Immun.* 1995;63(10):4166–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.63.10.4166-4169.1995>
16. West N.P., Jungnitz H., Fitter J.T., et al. Role of phosphoglucosyltransferase of *Bordetella bronchiseptica* in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect. Immun.* 2000;68(8):4673–80. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4673-4680.2000>
17. DeShazer D., Brett P.J., Woods D.E. The type II O-antigenic polysaccharide moiety of *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide is required for serum resistance and virulence. *Mol. Microbiol.* 1998;30(5):1081–100. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01139.x>

18. Ugalde J.E., Czibener C., Feldman M.F., Ugalde R.A. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect. Immun.* 2000;68(10):5716–23. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5716-5723.2000>
19. Winn A.M., Wilkinson S.G. Structures of the O4 and O18 antigens of *Stenotrophomonas maltophilia*: a case of enantiomeric repeating units. *Carbohydr. Res.* 2001;330(2):215–21. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00287-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00287-1)
20. Flores-Treviño S., Bocanegra-Ibarias P., Camacho-Ortiz A., et al. *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2019;17(11):877–93. DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1685875>
21. Huang T.P., Somers E.B., Wong A.C.L. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* 2006;188(8):3116–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.3116-3120.2006>
22. de Oliveira-Garcia D., Dall'Agnol M., Rosales M., et al. Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8(9):918–23. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0809.010535>
23. Zgair A.K., Chhibber S. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *J. Med. Microbiol.* 2011;60(7):1032–7. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.026377-0>
24. Zgair A.K., Chhibber S. *Stenotrophomonas maltophilia* flagellin restricts bacterial colonization in BALB/c mouse lung in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012;66(2):191–200. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00999.x>
25. Pompilio A., Crocetta V., Di Bonaventura G. *Stenotrophomonas maltophilia* mutant lacking flagella remains virulent in DBA/2N mice but is less efficient in stimulating TNF- α expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018;365(19). DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fny205>
26. Mahenthalingam E., Campbell M.E., Speert D.P. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 1994;62(2):596–605. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.62.2.596-605.1994>
27. Pompilio A., Crocetta V., Confalone P., et al. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 2010;10(1):102. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-102>
28. Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature.* 1987;325(6101):279–81. DOI: <https://doi.org/10.1038/325279a0>
29. Cheng S.T., Wang F.F., Qian W. Cyclic-di-GMP binds to histidine kinase RavS to control RavS-RavR phosphotransfer and regulates the bacterial lifestyle transition between virulence and swimming. *PLoS Pathog.* 2019;15(8):e1007952. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007952>
30. Chan C., Paul R., Samoray D., et al. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(49):17084–9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0406134101>
31. Christen M., Christen B., Folcher M., et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.* 2005;280(35):30829–37. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M504429200>
32. Caly D., Bellini D., Walsh M., et al. Targeting cyclic di-GMP signalling: a strategy to control biofilm formation? *Curr. Pharm. Des.* 2014;21(1):12–24. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905124701>
33. Arora S.K., Ritchings B.W., Almira E.C., et al. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.* 1997;179(17):5574–81. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.179.17.5574-5581.1997>
34. Hickman J.W., Harwood C.S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* 2008;69(2):376–89. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x>
35. Klose K.E., Mekalanos J.J. Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol. Microbiol.* 1998;28(3):501–20. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00809.x>
36. Stewart B.J., McCarter L.L. *Vibrio parahaemolyticus* FlaJ, a homologue of FliS, is required for production of a flagellin. *Mol. Microbiol.* 1996;20(1):137–49. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02496.x>
37. Yang J.G., Shih M.S., Kuo W.T., et al. Crystallization of the N-terminal regulatory domain of the enhancer-binding protein FleQ from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* 2014;70(Pt. 3):326–30. DOI: <https://doi.org/10.1107/S2053230X14001514>
38. Liu W., Tian X.Q., Wei J.W., et al. BsmR degrades c-di-GMP to modulate biofilm formation of nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sci. Rep.* 2017;7(1):4665. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04763-w>
39. Kang X.M., Wang F.F., Zhang H., et al. Genome-wide identification of genes necessary for biofilm formation by nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* reveals that orphan response regulator FsnR is a critical modulator. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015;81(4):1200–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03408-14>
40. Zheng L., Wang F.F., Ren B.Z., et al. Systematic mutational analysis of histidine kinase genes in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* identifies BfmAK system control of biofilm development. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016;82(8):2444–56. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03951-15>
41. Zhang X., Wang Y., Wu Y., et al. Dual regulatory role exerted by cyclic dimeric GMP To control FsnR-mediated bacterial swimming. *MBio.* 2022;13(5):e0141422. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.01414-22>
42. de Oliveira-Garcia D., Dall'Agnol M., Rosales M., et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol.* 2003;5(9):625–36. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00306.x>
43. Zgair A.K., Al-Adressi A.M.H. *Stenotrophomonas maltophilia* fimbrin stimulates mouse bladder innate immune response. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;32(1):139–46. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1729-0>
44. Nicoletti M., Iacobino A., Prosseda G., et al. *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: Genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011;301(1):34–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.07.003>
45. Crossman L.C., Gould V.C., Dow J.M., et al. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* 2008;9(4):R74. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r74>
46. Giltner C.L., Nguyen Y., Burrows L.L. Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012;76(4):740–72. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-12>
47. Travassos L.H., Pinheiro M.N., Coelho F.S., et al. Phenotypic properties, drug susceptibility and genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains from seven hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 2004;96(5):1143–50. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02248.x>

48. Trifonova A., Strateva T. *Stenotrophomonas maltophilia* — a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infect. Dis.* 2019;51(3):168–78.
DOI: <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1531145>
49. Adamek M., Linke B., Schwartz T. Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach. *Microb. Pathog.* 2014;67-68:20–30.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.02.001>
50. Alavi P., Starcher M.R., Thallinger G.G., et al. *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics.* 2014;15(1):482.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-482>
51. DuMont A.L., Karaba S.M., Cianciotto N.P. Type II secretion-dependent degradative and cytotoxic activities mediated by *Stenotrophomonas maltophilia* serine proteases StmPr1 and StmPr2. *Infect. Immun.* 2015;83(10):3825–37.
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00672-15>
52. DuMont A.L., Cianciotto N.P. *Stenotrophomonas maltophilia* serine protease StmPr1 induces matrilysis, anoikis, and protease-activated receptor 2 Activation in human lung epithelial cells. *Infect. Immun.* 2017;85(12):e00544-17.
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00544-17>
53. Windhorst S., Frank E., Georgieva D.N., et al. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Biol. Chem.* 2002;277(13):11042–9.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109525200>
54. Ribitsch D., Heumann S., Karl W., et al. Extracellular serine proteases from *Stenotrophomonas maltophilia*: screening, isolation and heterologous expression in *E. coli*. *J. Biotechnol.* 2012;157(1):140–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.025>
55. Nas M.Y., Gabell J., Cianciotto N.P. Effectors of the *Stenotrophomonas maltophilia* Type IV secretion system mediate killing of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio.* 2021;12(3):e0150221. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01502-21>
56. Nas M.Y., White R.C., DuMont A.L., et al. *Stenotrophomonas maltophilia* encodes a VirB/VirD4 type IV secretion system that modulates apoptosis in human cells and promotes competition against heterologous bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 2019;87(9).
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00457-19>
57. Ramos-Hegazy L., Chakravarty S., Anderson G.G. Phosphoglycerate mutase affects *Stenotrophomonas maltophilia* attachment to biotic and abiotic surfaces. *Microbes Infect.* 2020;22(1):60–4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.08.001>
58. Di Bonaventura G., Picciani C., Lupetti V., Pompilio A. Comparative proteomic analysis of protein patterns of *Stenotrophomonas maltophilia* in biofilm and planktonic lifestyles. *Microorganisms.* 2023;11(2):442.
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020442>
59. Pompilio A., Savini V., Fiscarelli E., et al. Clonal diversity, biofilm formation, and antimicrobial resistance among *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(1):15.
DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010015>
60. Alio I., Gudzuhn M., Pérez García P., et al. Phenotypic and transcriptomic analyses of seven clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates identify a small set of shared and commonly regulated genes involved in the biofilm lifestyle. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020;86(24):e02038-20.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02038-20>
61. Lin Y.T., Huang Y.W., Liou R.S., et al. MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014;69(12):3221–6. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dku317>
62. Huang Y.W., Hu R.M., Chu F.Y., et al. Characterization of a major facilitator superfamily (MFS) tripartite efflux pump EmrCABsm from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(11):2498–505.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt250>
63. Hu R.M., Liao S.T., Huang C.C., et al. An inducible fusaric acid tripartite efflux pump contributes to the fusaric acid resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One.* 2012;7(12):e51053.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051053>
64. Gil-Gil T., Martínez J.L., Blanco P. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: a review of current knowledge. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2020;18(4):335–47. DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1730178>
65. Wu C.J., Chen Y., Li L.H., et al. Efflux systems in iron homeostasis of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microbiol. Spectr.* 2022;10(3):e0244821.
DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02448-21>
66. Hirakata Y., Srikumar R., Poole K., et al. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* 2002;196(1):109–18.
DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20020005>
67. Brunson D.N., Maldosevic E., Velez A., et al. Porin loss in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates impacts production of virulence factors and survival within macrophages. *Int. J. Med. Microbiol.* 2019;309(3-4):213–24.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.04.001>
68. Jurado R.L. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin. Infect. Dis.* 1997;25(4):888–95.
DOI: <https://doi.org/10.1086/515549>
69. Kalidasan V., Joseph N., Kumar S., et al. Iron and virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*: all we know so far. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018;8:401.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00401>
70. Nairz M., Schroll A., Sonnweber T., Weiss G. The struggle for iron — a metal at the host-pathogen interface. *Cell Microbiol.* 2010;12(12):1691–702.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x>
71. García C.A., Alcaraz E.S., Franco M.A., Passerini de Rossi B.N. Iron is a signal for *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence. *Front. Microbiol.* 2015;6:926.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00926>
72. Huang T.P., Lee Wong A.C. A cyclic AMP receptor protein-regulated cell-cell communication system mediates expression of a FecA homologue in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(15):5034–40.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00366-07>
73. Pappenfort K., Bassler B.L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14(9):576–88.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
74. Huedo P., Yero D., Martínez-Servat S., et al. Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. *J. Bacteriol.* 2014;196(13):2431–42. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01540-14>
75. Huedo P., Kumar V.P., Horgan C., et al. Sulfonamide-based diffusible signal factor analogs interfere with quorum sensing in *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *Future Med. Chem.* 2019;11(13):1565–82.
DOI: <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0015>
76. Huedo P., Yero D., Martínez-Servat S., et al. Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* 2015;6:761. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00761>
77. Yero D., Huedo P., Conchillo-Solé O., et al. Genetic variants of the DSF quorum sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia* influence virulence and resistance phenotypes among genotypically diverse clinical isolates. *Front. Microbiol.* 2020;11:1160.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01160>

78. Martínez P., Huedo P., Martínez-Servat S., et al. *Stenotrophomonas maltophilia* responds to exogenous AHL signals through the LuxR solo SmoR (Smt1839). *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015;5:41.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00041>
79. McCarthy Y., Dow J.M., Ryan R.P. The Ax21 protein is a cell-cell signal that regulates virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* 2011;193(22):6375–8.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.05949-11>
80. Devos S., Van Oudenhove L., Stremersch S., et al. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* 2015;6:298.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00298>
81. Park H.J., Lee S.W., Han S.W. Proteomic and functional analyses of a novel porin-like protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Microbiol.* 2014;52(12):1030–5.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4442-0>

Информация об авторах

Михайлович Владимир Михайлович — д.б.н., с.н.с., зам. зав. лаб. биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4894-1304>

Гейдаров Рустам Николаевич — старший лаборант лаб. биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4971-2629>

Бочарова Юлия Александровна — к.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0197-0255>

Чеботарь Игорь Викторович[✉] — д.м.н., зав. лаб. молекулярной микробиологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, nizarnn@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>

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 04.07.2023;
принята к публикации 03.10.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Vladimir M. Mikhailovich — D. Sci. (Biol.), senior researcher, Deputy Head, Laboratory of biological microchips, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4894-1304>

Rustam N. Geydarov — senior laboratory assistant, Laboratory of biological microchips, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4971-2629>

Julia A. Bocharova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0197-0255>

Chebotar Igor Viktorovich[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of molecular microbiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, nizarnn@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>

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 04.07.2023;
accepted for publication 03.10.2023;
published 28.10.2023

НЕКРОЛОГ

Памяти Беседновой Наталии Николаевны (02.02.1935–23.09.2023)



Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора с прискорбием сообщает, что 23 сентября 2023 года на 89-м году жизни скончалась Наталия Николаевна Беседнова, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, действительный член Российской академии наук, лауреат Государственной премии СССР, выдающийся учёный, блестящий организатор, прекрасный педагог и замечательный человек.

Наталия Николаевна Беседнова родилась 2 февраля 1935 г. в г. Клязьма Московской области. После окончания в 1959 г. Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова по распределению приехала во Владивосток, где начала работать врачом-эпидемиологом городской санитарно-эпидемиологической станции. С 1960 г. трудовая деятельность Н.Н. Беседновой связана с Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии, где она прошла путь от младшего научного сотрудника до руководителя лаборатории, заместителя директора по научной работе и директора Института, которым успешно руководила на протяжении двух десятилетий.

В 1969 г. Наталия Николаевна защитила кандидатскую диссертацию, в 1980 г. — докторскую диссертацию на тему «Экспериментальное и клинико-эпидемиологическое изучение псевдотуберкулёзной инфекции». В 1991 г. ей было присвоено звание профессора по специальности «Аллергология и иммунология». В 1993 г. Н.Н. Беседнова была избрана членом-корреспондентом, в 2000 г. — ака-

демиком Российской академии медицинских наук. С 2013 г. Н.Н. Беседнова — действительный член Российской академии наук.

В последние годы своей научной деятельности Н.Н. Беседнова занимала должность главного научного сотрудника Института.

Научная деятельность Н.Н. Беседновой была сосредоточена на проблемах диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Под её руководством выполнены циклы обширных исследований по иммунологии брюшного тифа, псевдотуберкулёза, дифтерии. В 1989 г. за работу по изучению нового клинико-эпидемического проявления псевдотуберкулёзной инфекции у человека (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) в числе групп сотрудников Института Н.Н. Беседнова была удостоена Государственной премии СССР.

В 1970-х гг. Наталья Николаевна явилась инициатором создания и развития нового научного направления по изучению клеточных и молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия биологически активных веществ из гидробионтов Тихого океана, организовав широкое сотрудничество с Тихоокеанским институтом биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Тихоокеанским научно-исследовательским рыбохозяйственным центром, Тихоокеанским государственным медицинским университетом и практическими учреждениями здравоохранения. В результате исследований, координируемых Н.Н. Беседновой, были получены новые данные об иммуномодулирующих, антибактериальных, противовирусных, противоопухолевых, антиадгезивных, антиэндогенных, про-

апоптотических, гепатозащитных, гиполипидемических свойствах биологически активных веществ морского происхождения, установлены клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия, обоснована возможность конструирования инновационных лекарственных средств на их основе, разработаны экологически безопасные продукты функционального питания и биологически активных добавок к пище, удостоенные золотых и платиновых знаков качества, дипломов победителей национальных и зарубежных конкурсов. Н.Н. Беседнова являлась научным руководителем Клинико-диагностического центра геронтологии и биотерапии, созданного при её участии на базе терапевтического отделения Медицинского объединения ДВО РАН, где проводится оценка клинической эффективности препаратов на основе биологически активных веществ из объектов наземной и морской флоры и фауны Дальнего Востока.

Н.Н. Беседновой создана школа высококвалифицированных специалистов в области микробиологии и иммунологии, многие из которых в настоящее время работают на кафедрах в вузах, заведуют лабораториями института, отделениями клиник. Под её руководством защищены 31 кандидатская и 6 докторских диссертаций. Н.Н. Беседнова является автором более 300 печатных работ, 32 патентов, 15 монографий, пособий для практических врачей, технологической документации.

С 2014 г. Н.Н. Беседнова возглавила работу Объединённого учёного совета ДВО РАН по медицинским и физиологическим наукам, многие годы являлась членом диссертационных советов ДКМ 208.007.02 и Д 307.012.01, членом Координационного совета и Чрезвычайной противоэпидемической комиссии при Департаменте здравоохранения администрации Приморского края, членом редакционных коллегий журнала «Антибиотики и химиотерапия», «Бюллетень Сибирского отделения РАМН», «Тихоокеанский медицинский журнал», «Здоровье. Медицинская экология. Наука».

В 2001 г. Н.Н. Беседновой было присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации». Её весомый вклад в науку отмечен высокими наградами СССР и Российской Федерации: орденом «Знак Почета», медалью ВДНХ, орденом Дружбы, медалью им. академика В.И. Покровского.

На протяжении всей своей трудовой деятельности Наталья Николаевна Беседнова оставалась интеллигентным, добрым и внимательным к коллегам и друзьям человеком, отдавала все силы, знания и опыт сотрудникам института.

Ушла из жизни замечательная женщина. Её не забудут те, кто когда-либо общался с ней. Нам всем будет не хватать доброго друга и мудрого наставника. Светлая память о ней навсегда сохранится в наших сердцах.