

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 Vopengamag, 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, Martynovskiy 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
- Игнатьев 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., Mariandyshv 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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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., Афонина 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 клоны 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 клоны 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 клоны 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., 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. *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>

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>

Введение

Вирус ветряной оспы (Varicella-Zoster virus, VZV) относится к семейству *Herpesviridae*, роду *Varicellovirus*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*. Характерными чертами представителей данного подсемейства являются короткий репродуктивный цикл, быстрое распространение и эффективное разрушение инфицированных клеток. VZV способен реплицироваться в ограниченном спектре организмов-хозяев, который включает исключи-

тельно клетки человеческого и обезьяньего происхождения. Ежегодная заболеваемость ветряной оспой (ВО) колеблется от 13 до 16 случаев на 1000 человек с существенными вариациями по годам. В странах с умеренным климатом заболеваемость ВО, в зависимости от возраста, наиболее высока среди детей дошкольного (1–4 года) или младшего школьного возраста (5–9 лет) и составляет более 100 случаев на 1000 детей в год. Таким образом, более 90% людей заражаются до подросткового возраста,

и лишь небольшая часть взрослых (< 5–10%) остаётся восприимчивой к заболеванию. В тропическом климате заражение происходит в более высоком общем среднем возрасте, при этом доля случаев заболевания среди взрослых выше [1, 2].

Инфицирование VZV имеет ярко выраженный сезонный характер, пик заболеваемости приходится на зимний и весенний периоды, при этом с периодичностью 2–3 года происходят вспышки заболеваемости. В развитых странах 5 из 1000 больных ВО госпитализируются, а 2–3 случая заболевания на 100 тыс. инфицированных заканчиваются летально [2]. В довакцинальную эпоху ВО являлась повсеместно встречающейся детской инфекцией в странах с умеренным климатом. К примеру, в США порядка 98% населения к возрасту 20 лет были сероположительны к VZV.

Первая живая аттенуированная вакцина (vOка) против данного возбудителя была получена в 1974 г. путём серии пассажей клинического изолята VZV (Ока) дикого типа. Позднее данная вакцина была усовершенствована, в результате был выпущен препарат «Varivax» («Merck Sharp & Dohme Corp.») [3]. Живая аттенуированная вакцина состоит из смеси различных геновариантов VZV, содержащих 42 однонуклеотидных полиморфизма, которые отличают vOка от родительского штамма Ока дикого типа [2]. Благодаря разработанной вакцине и введению в разных странах обязательных программ вакцинации против VZV, госпитализация и смертность от ВО среди детей снизилась более чем на 90% [2, 3].

Геном вируса ветряной оспы

Как и все герпесвирусы, VZV является двучепочным ДНК-вирусом и имеет геном размером 125 000 п.н., включающий 72 открытые рамки считывания (ORF), образующие 71 ген. Поскольку 3 гена представляют из себя копии других генов, то геном содержит 68 уникальных генов. Геном вируса состоит из двух основных кодирующих областей: уникальной длинной (U_L) и уникальной короткой (U_S). Регион U_L фланкирован короткими (около 88 п.н.) инвертированными повторами TR_L и IR_L , тогда как область U_S окружена длинными (7319 п.н.) повторами TR_S и IR_S . Пять участков генома содержат тандемные прямые повторы (R1, R2, R3, R4 и R5), которые представляют собой короткие последовательности с высоким содержанием G + C [4, 5]. Три из этих повторяющихся последовательностей (R1, R2 и R3) расположены в кодирующей области генов *ORF11*, *ORF14* и *ORF22* соответственно и, таким образом, могут оказывать влияние на функции белков. Две копии R4 находятся внутри повторов *IR* и *TR*, соседних с точкой начала репликации (*OriS*), а R5 расположен между *ORF60* и *ORF61* [5].

Генотипирование VZV

До 2008 г. не существовало единой номенклатуры для типирования VZV. Ранняя классификация VZV была основана на результатах анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Маркеры ПДРФ, задействованные в данных исследованиях, включали полиморфизм *ORF38* (*PstI*), *ORF54* (*BglI*) и *ORF62* (*SmaI*) [6, 7]. Таким образом, большинство штаммов дикого типа из США и Европы были охарактеризованы как *PstI*⁺*BglI*⁺; штаммы, распространённые на территории Азии и Африки, — как *BglI*⁺; Ока-подобные штаммы дикого типа из Японии — как *PstI*⁺/*PstI*⁻*BglI*⁺*SmaI*⁺; вакцинные штаммы Ока — как *PstI*⁻*BglI*⁺*SmaI*⁺ [7, 8].

Предпринимались попытки идентификации вариантов VZV при помощи полногеномного скрининга на наличие однонуклеотидных замен посредством гетеродуплексной мобильности. Данный подход использовался для оценки замен в *ORF1*, *ORF21*, *ORF50* и *ORF54*, что позволило выделить 4 основные клады (геноварианта), названные А, В, С и J. В кладе А кластеризовались штаммы из Африки и Азии, тогда как клады В и С преимущественно состояли из европейских штаммов. Впоследствии к этой схеме генотипирования была добавлена клада J для учёта японских штаммов [9, 10].

Другой подход к генотипированию основывается на анализе однонуклеотидных полиморфизмов в последовательностях генов 5 гликопротеинов (*gH*, *gL*, *gB*, *gE*), а также основного гена трансактиватора *IE62*. Благодаря этому штаммы VZV были классифицированы в 4 клады: А, В, С и D. Клады А и D были представлены изолятами, отобранными на территории Северной Америки и Европы, клады В и С состояли из представителей VZV, распространённых на территории Сингапура и Японии соответственно [11, 12]. Необходимо отметить, что хотя номенклатура клад из данного исследования во многом схожа с номенклатурой, использованной в работах W. Barrett-Muir и соавт. [8, 9], она не имеет корреляции между рассматриваемыми методами типирования.

Более поздние филогенетические анализы, включающие как полные геномы VZV, так и их фрагменты, позволили соотнести геномные вариации со специфичными геновариантами и предположительно рекомбинантными вирусами. Посредством мультилокусного анализа полиморфизмов в геномных последовательностях VZV были выделены 3 основных геноварианта (клады): Е (Европейский), J (Японский) и М (мозаичный) [13]. Впоследствии геновариант М был разделён на 4 отдельных варианта: М1, М2, М3, М4 [13, 14]. Принадлежащие к геновариантам М1 и М2 штаммы были наиболее распространены в тропических регионах, геновариант Е — в умеренных широтах, геновариант J — в Японии. В отдельных исследо-

ваниях штамм с геновариантом М3 был обнаружен в США, а штаммы с геновариантом М4 — в Испании и Франции [14, 15].

Поскольку номенклатура клад/геновариантов VZV была основана на различных методах молекулярного типирования, в 2008 г. была введена новая универсальная номенклатура, разделяющая геноварианты на 5 основных клад (1–5) с 2 условными (кандидатными) кладами (VI и VII) [16]. Также теперь для выделения VZV в отдельную кладу необходимо, чтобы к ней относились как минимум 2 представителя, для которых получены последовательности полного генома. В ином случае такая кладу считается кандидатной и обозначается римскими цифрами.

Благодаря секвенированию полных геномов из клинических образцов VZV, взятых на территории Германии, были обнаружены как штаммы, принадлежащие к кладам 1, 3 и 5, так и штаммы, которые не относились ни к одной из известных клад. Поэтому данные представители (1483/2005 и 457/2008) были выделены в отдельные кандидатные клады — VIII и IX соответственно [17]. Позднее, в ходе работы по исследованию событий рекомбинации между представителями различных клад VZV, был обнаружен штамм, который сгруппировался с единственным представителем клады VI на филогенетическом древе. Таким образом, в 2015 г. кандидатная кладу VI была преобразована в основную кладу 6 [18]. В 2017 г. ранее использовавшаяся схема генотипирования VZV была усовершенствована, за счёт чего удалось выявить новых представителей кандидатной клады IX (одного полного и одного частичного генома). При этом ранее был идентифицирован и описан только один изолят, принадлежащий к данной клады (JN704710). Наличие полной последовательности генома изолята KY037798, идентифицированного в данном исследовании, соответствовало требованию к преобразованию кандидатной клады IX в основную кладу 9 [19].

На сегодняшний день разнообразие VZV представлено 8 кладами: 7 основных (1–6 и 9) и 1 кандидатная кладу VIII; кладу VII стала неактуальной ввиду отсутствия новых изолятов. Основные клады VZV, как правило, имеют географическую привязку к определённым регионам. В частности, клады 1, 3 и 6 в основном распространены в Европе, Северной Америке и Австралии, кладу 2 — преимущественно в Азии. Клады 4 и 5, как правило, имеют распространение во множестве регионов по всему миру; кладу 5 является единственной, о циркуляции которой сообщается в Африке [20]. Несмотря на обширное количество информации о циркулирующих по всему миру кладах VZV, распределение клад VZV в России не освещено в достаточной степени. В научной литературе практически отсутствует актуальная информация по данной теме. Сообщается,

что в северном регионе Китая Синьцзян, который граничит с Россией, преобладают клады 1 и 3 [21].

В качестве первого шага к получению достоверных данных о циркулирующих на территории России представителях различных клад VZV нами была разработана специфичная праймерная панель, позволяющая типировать VZV в соответствии со схемой, предложенной N.J. Jensen и соавт. [19]. Панель включает 6 пар праймеров, охватывающих короткие (порядка 200 п.н.) области открытых рамок считывания: ORF21, ORF22, ORF 29, ORF38, ORF55, ORF67, которые содержат 7 однонуклеотидных замен, по уникальным композициям которых возможно определить принадлежность вируса к одной из известных клад. Благодаря модификации праймеров путём объединения с адаптерными последовательностями Nextera в совокупности с возможностью секвенирования получаемых ДНК-библиотек на платформе «Illumina» с наборами реагентов для коротких прочтений, удаётся получить результаты типирования в течение 48 ч. Таким образом, разработанная праймерная панель позволяет сократить финансовые и временные затраты при одновременном увеличении количества образцов в одном запуске прибора для высокопроизводительного секвенирования.

Разработанное нами решение, предназначенное для быстрого скрининга большого числа клинических образцов, было протестировано на образцах из Москвы, Московской области и Ставропольского края, что позволило рассмотреть представленность VZV в отдельных регионах РФ в первом приближении.

Материалы и методы

Образцы VZV

В исследовании использованы 75 образцов VZV, собранных в период с июня 2022 г. по июль 2023 г. Клинические образцы вирусов были получены от пациентов преимущественно из Москвы (61 образец), а также из Московской области (9 образцов) и Ставропольского края (5 образцов). Забор биологического материала производили после получения добровольного информированного согласия пациентов или их представителей. Проводимое исследование одобрено на заседании Локального этического комитета ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора от 24.05.2022 (протокол № 124).

Выделение ДНК и получение фрагментов геномов VZV

Вирусную ДНК выделяли из клинических образцов с использованием набора реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс»). Полученную ДНК затем использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР с целью амплификации фрагментов

генома VZV. Области открытых рамок считывания (ORF21, ORF22, ORF 29, ORF38, ORF55, ORF67), содержащие дискриминирующие мутации, в соответствии с которыми возможно произвести типирование VZV, получали при помощи разработанного набора праймеров (табл. 1), смешанных в пул (табл. 2).

Аmplification проводили в 25 мкл реакционной смеси со следующим составом: 10 мкл ПЦР-смесь-2 blue («АмплиСенс»), 1,8 мкл 4,4 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфата («АмплиСенс»), 1 мкл

смеси праймеров, 5 мкл ДНК-матрицы; до требуемого объема реакционную смесь доводили H₂O. Для амплификации использовали следующий температурно-временной протокол: 95°C — 2 мин; затем 40 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 30 с, 72°C — 1 мин; финальная элонгация: 72°C — 3 мин. Целевые фрагменты геномов VZV идентифицировали по свечению бромистого этидия в 1,7% агарозном геле. Визуализацию результатов электрофоретического анализа проводили при помощи «GelDoc EZ» («Bio-Rad»).

Таблица 1. Список праймеров, используемых для амплификации фрагментов генома VZV

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

Праймер Primer	Последовательность праймера с адаптерной последовательностью Nextera (5'→3') Primer sequence with Nextera adapter sequence (5'→3')
VZV_1_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgcggtttaacttcacaatgtaat
VZV_1_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGctcatctggacgaagcca
VZV_2.2_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGtaccacacaagcacgtcag
VZV_2.2_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGtcatcaaaccatgtaaacctc
VZV_3_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGaatatgttacggggaccttga
VZV_3_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcaaacaccccaataggttga
VZV_4_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgccatataccgcaacaactg
VZV_4_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcctcgccataaagccactac
VZV_5_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGccaccacggtggactatg
VZV_5_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGgaggagaccgtacgcga
VZV_6_fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGctttgatctcaaggcgac
VZV_6_rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcgctatagttgtcccgt

Примечание. Прописными буквами обозначены адаптерные последовательности Nextera, «сшитые» с праймерами (обозначены строчными буквами).

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

Таблица 2. Состав смеси праймеров для типирования VZV

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

Праймер Primer	Концентрация праймеров в стоке, пмоль/мкл Primer concentration in mix, pmol/μl	Концентрация после разведения в 2 раза, пмоль/мкл 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

Подготовка библиотек для секвенирования

Очистку ПЦР-продукта от реакционной смеси осуществляли с использованием «AMPureXP beads» («Beckman Coulter») в соотношении 1 : 0,8 (образец : частицы). Праймеры, используемые для амплификации сегментов генома VZV, модифицированы путём совмещения с адаптерами «Nextera» («Illumina»), в результате чего получаемые ампликоны оказываются фланкированы специфичными последовательностями, облегчающими процесс подготовки библиотек. Баркодирование проводили с использованием 10 мкл ПЦР-смеси-2 blue («АмплиСенс»), 1 мкл EvaGreen («Biotium») в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя, 2 мкл каждого из баркодов (5 пмоль) и 8 мкл очищенного ПЦР-продукта. Для баркодирования использовали следующий температурно-временной протокол: 98°C — 30 с; 12 циклов: 98°C — 10 с, 65°C — 1 мин 15 с. Концентрацию ДНК после баркодирования измеряли на флуориметре «Qubit 4.0» с использованием набора «Qubit dsDNA HS Assay Kit» («Thermo Fisher Scientific»). Готовые библиотеки были объединены и очищены при помощи магнитных частиц «AMPureXP beads» («Beckman Coulter»). Длины готовых библиотек идентифицировали с использованием системы автоматизированного электрофореза «2100 Bioanalyzer» («Agilent Technologies»).

Секвенирование библиотек VZV

Секвенирование осуществляли на платформе «Illumina MiSeq» с использованием набора реагентов «MiSeq Reagent Kit v2» (300 циклов) и «MiSeq Reagent Kit v3» (600 циклов). При этом на один образец отводилось менее 0,5% запуска «MiSeq».

Определение последовательностей ДНК и геновариантов образцов

После получения «сырых» данных с прибора прочтения ДНК были триммированы от вышеописанных праймерных последовательностей с помощью программного инструмента *fastp 0.23.0* [22]. Далее с помощью *bwa 0.7.17* [23] прочтения были выровнены («картированы») на референсную последовательность вируса *NC_001348.1*, отсортированы и индексированы с помощью *samtools 1.15.1* [24]. Получившиеся выравнивания были представлены в виде черновых сборок генома с помощью *samtools 1.15.1* и собственного скрипта, после чего перекартированы с помощью *MAFFT v7.490* [25] для получения финальных сборок (консенсусных последовательностей).

Согласно вышеупомянутой номенклатуре вирусных клад [19], для успешного генотипирования достаточно задействовать всего 7 позиций, сочетание вариантов (однонуклеотидных замен) в которых указывает на ту или иную кладу (табл. 3). Сконструированные нами праймеры (табл. 1) составлены таким образом, чтобы включать данные варианты.

Результаты

Разработанная нами праймерная панель, описанная в предыдущем разделе, охватывает короткие сегменты 6 открытых рамок считывания: ORF21, ORF22, ORF29, ORF38, ORF55 и ORF67, которые содержат однонуклеотидные замены, являющиеся целевыми для осуществления типирования VZV. С использованием данной панели нами было произведено секвенирование клинических образцов VZV, полученных от пациентов из Москвы, Московской области и Ставропольского края. Полученные

Таблица 3. Схема генотипирования, предложенная N.J. Jensen и соавт. [19] (адаптировано)

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

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

Примечание. Чёрным выделены наименее распространённые «дискриминирующие» варианты.

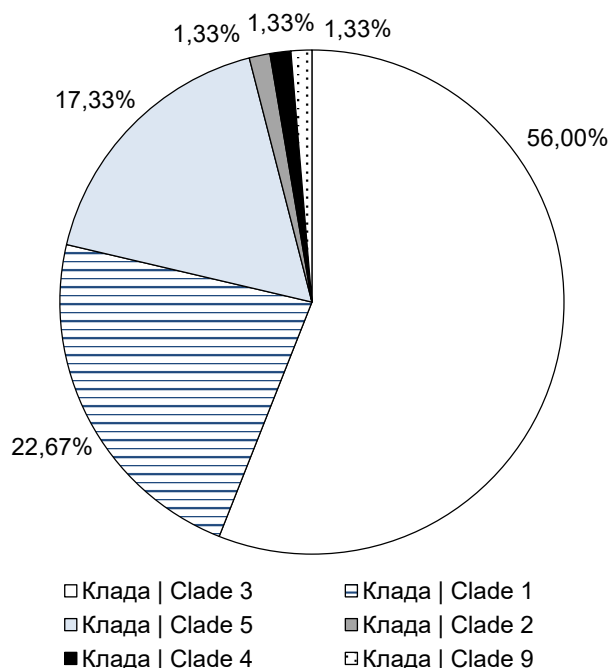
Note. The least common “discriminatory” variants are highlighted in black.

последовательности сегментов открытых рамок считывания были отсекарованы на приборе «Illumina MiSeq», при этом среднее покрытие составило приблизительно 10^4 . Минимальное покрытие для каждого сегмента было около 300 прочтений. Консенсусные последовательности получали путём обработки «сырых» данных секвенирования с использованием ранее описанных общедоступных биоинформатических инструментов и собственного скрипта. Собранные консенсусные последовательности использовали в качестве входных данных для разработанного алгоритма, осуществляющего генотипирование VZV на основе дискриминирующих мутаций. Применяя данный алгоритм генотипирования, мы установили, что 17 образцов (22,67% от общего числа анализируемых последовательностей) приходились на клад 1, 42 образца (56%) — на клад 3 (рисунок), 13 (17,33%) образцов принадлежали к кладе 5. Помимо этого, среди всех секвенированных образцов нами выявлены единичные случаи инфекций, вызванных вирусами клад 2 (1,4%), 4 (1,4%) и 9 (1,4%) VZV (рисунок).

Обсуждение

В ходе данного исследования нами была разработана и оптимизирована методика быстрого типирования большого количества образцов VZV. Более того, используя описанный протокол генотипирования, мы получили первичные данные по клатам VZV, которые получили распространение на территории Москвы, Московской области и Ставропольского края. С использованием технологий секвенирования следующего поколения мы установили, что в рассматриваемых регионах получили распространение преимущественно вирусы, принадлежащие к клатам 1, 3 и 5. Также нами были обнаружены единичные образцы, относящиеся к кладе 2, кладе 4 и кладе 9, которые на фоне остальных клатов являются минорной частью циркулирующих в этих областях РФ VZV. Стоит уточнить, что полученная картина распределения клатов является наиболее правдоподобной для Москвы, так как наибольшее количество клинических образцов было получено именно из этого региона РФ. В дальнейшем, при наличии соответствующей возможности, планируется как увеличить общее количество образцов из регионов, рассматриваемых в данной работе, так и включить в исследование другие регионы России.

На текущий момент данные, полученные в результате нашего исследования, лишь позволяют предположить о во многом схожей картине распределения представителей VZV в исследуемых регионах РФ и в странах Европы [20], а также соответствуют ранее приведенным данным о циркулирующих клатах VZV в регионе Китая, граничащем с Россией [21]. Однако в исследуемых регионах, по-видимому, значительно бóльшую долю занима-



Представленность различных клатов VZV в отдельных регионах РФ.

Representation of various clades of VZV in the Russian Federation

ют вирусы, принадлежащие к кладе 3, кроме этого, процент представленности вирусов клата 5 в данных областях РФ также более высокий, нежели в европейских странах.

Заключение

VZV, этиологический агент ВО и опоясывающего герпеса, подразделяется на несколько ветвей, характеризующихся различными генетическими свойствами. Мы успешно использовали метод секвенирования следующего поколения для генотипирования VZV, что включает специальную панель праймеров и алгоритм генотипирования — подход, позволяющий ускорить процесс сбора данных и снизить затраты на подготовку образцов, особенно при увеличении количества образцов в одном цикле секвенирования. Используя эту методологию, мы установили, что в Москве, Московской области и Ставропольском крае преобладают клаты 1, 3 и 5 VZV. Идентификация этих клатов VZV предоставляет ценные эпидемиологические данные, полезные для формирования стратегий общественного здравоохранения, и приоткрывает завесу над распространённостью клатов VZV в некоторых регионах РФ.

Отметим, что настоящее исследование является «пилотным» и по большей части носит методологический характер. Стоит также упомянуть, что в данной работе нами продемонстрирована распространённость клатов VZV только для 3 из множества регионов РФ, таким образом, вопрос о глобальной

представленности различных клад вируса в нашей стране остаётся открытым и поэтому следует продолжить, а также расширить будущие исследования в целях формирования достоверной картины распределения клад VZV на территории России.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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)
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>

Информация об авторах

Надтока Максим Игоревич — м.н.с. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, maximnadтока@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>

Information about the authors

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

Vladislav G. Lysenkov — 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>

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 ИСМЖЕ, 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

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

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>

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>

Введение

Listeria monocytogenes вызывает опасную пищевую инфекцию с высокой (около 30%) летальностью у людей, находящаяся в группе риска, а также у домашних и диких животных [1, 2]. Генетическую структуру вида *L. monocytogenes* подразделяют на 4 филогенетические линии [3].

I филогенетическая линия включает клональные комплексы (CC) CC1, CC2, CC4 и CC6, наиболее часто ассоциированные с листериозом у человека [4]. Штаммы CC1 и CC2 были разными методами отнесены к эпидемическим клонам ECII и ECIV соответственно, вызвавшим крупные вспышки ли-

стериоза в разных странах, в том числе в России. В Европе и США среди изолятов, выделенных из клинических случаев, преобладают штаммы CC1, на долю которых приходится 11,4% [5].

На территории России до 1980 г. доминировали штаммы II линии, выделяемые как из случаев листериоза у людей и животных, так и из природных источников, большая часть которых относилась к CC7 (также известному как эпидемический клон ECVII) [6]. Штаммы CC7 и до настоящего времени преобладают в природных очагах на территории европейской части России, а также их часто выделяют при спорадических случаях листериоза у людей и

животных [7]. Штаммы относящегося ко II линии СС9 часто выделяют из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, в том числе на территории России [7]. В структуре инфекционной патологии стран Европы и Северной Америки штаммы СС7 относят к штаммам средней вирулентности, а клональный комплекс СС9 считают низковирулентным [8]. Разницу в частоте встречаемости среди клинических изолятов и, соответственно, в потенциальной вирулентности штаммов, относящихся к разным СС и/или филогенетическим линиям, разные авторы связывают с наличием дополнительных факторов вирулентности [9], аллельным разнообразием факторов вирулентности [10], а также уровнем их экспрессии [11].

Начальным этапом инфекции является взаимодействие листерий с непрофессиональными фагоцитами при помощи белков, относящихся к семейству интерналинов, — InlA и InlB, которые позволяют *L. monocytogenes* проникать в энтероциты кишечника и эпителиальные клетки через взаимодействие с целевыми рецепторами. Специфическим рецептором InlA является E-кадгерин. InlB специфически взаимодействует с двумя рецепторами: с-Met и gC1q-R [12]. Для инвазии в энтероциты достаточно наличия функционального InlA [13], в гепатоциты — только InlB [14], а совместное действие InlA и InlB опосредует пересечение плацентарного барьера [15].

Для установления аллельного разнообразия генов *inlA* и *inlB* проводят их секвенирование. Результаты этих исследований показывают, что клинические штаммы и, что наиболее важно, штаммы, вызывающие внутриутробные и неонатальные инфекции, экспрессируют полноразмерный InlA чаще, чем штаммы пищевого происхождения. Укороченный InlA был обнаружен в большинстве гиповирулентных изолятов СС9 и СС121 [16] и в других клональных комплексах филогенетической линии II (например, СС331, СС199 и СС321) [4].

Ранее было показано, что клинические и пищевые изоляты отличаются уровнем экспрессии генов *inlA* и *inlB* [11]. Экспрессия ключевых факторов патогенности активируется во время клеточной инфекции и зависит от регулятора транскрипции PrfA. *L. monocytogenes* имеет сложную систему перекрёстных взаимодействий между регуляторными цепями σ^B и PrfA, чтобы обеспечить оптимальную реализацию генов, необходимых во внешней среде, включая репрессию генов, связанных с вирулентностью. И наоборот, внутри организма эта регуляторная сеть обеспечивает повышенную экспрессию генов, связанных с вирулентностью, для успешной инвазии [17]. Активность PrfA снижается при культивировании *L. monocytogenes* на богатой питательной среде. Гидрофобные адсорбенты, включённые в состав среды культивирования, активируют PrfA

и индуцируют повышенную активность генов факторов вирулентности [18]. Однако механизмы, контролирующие уровень продукции соответствующих белков-факторов патогенности, остаются неисследованными.

Для оценки уровня экспрессии белков используют разнообразные методы, такие как ферментативная активность целевого образца и иммуноблотинг. Оценку ферментативной активности невозможно использовать, если белки не являются биокатализаторами. Применение иммуноблотинга является трудоёмким процессом, в котором анализ невозможно провести с большим числом образцов. В качестве альтернативного метода для качественной и количественной идентификации InlA и InlB была разработана тест-система на основе иммуноферментного анализа (ИФА). Используя данную ИФА-тест-систему, мы проанализировали изоляты *L. monocytogenes* из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи на предмет уровня экспрессии InlA и InlB и его корреляции с филогенетическим положением штаммов.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования бактерий

В работе использованы штаммы *Listeria* spp. из коллекции НИЦЭМ им. Гамалеи (табл. 1). Культивирование микроорганизмов осуществляли в жидкой питательной среде ВНИ («Becton Dickinson») при 37°C в режиме постоянного встряхивания при 180 об/мин. Для активации PrfA в бульон ВНИ добавляли 1% (мас/об.) гидрофобного адсорбента Amberlite XAD 4 («Sigma-Aldrich»).

ПЦР-анализ

Коллекционные изоляты *L. monocytogenes* лизировали лизоцимом в концентрации 20 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C, далее лизаты обрабатывали протеиназой К в концентрации 25 мкг/мл при 56°C в течение 1 ч. Полученные образцы кипятили на водяной бане в течение 10 мин. Амплификацию генов *inlA* и *inlB* осуществляли в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология») по следующей программе с использованием TransStartTaq-ДНК-полимеразы («TransGen»): 1-й этап (1 цикл): 94°C — 4 мин; 2-й этап (30 циклов): 94°C — 30 с, 52°C — 30 с, 72°C — 2 мин; 3-й этап (1 цикл): 72°C — 10 мин. Праймеры подбирали в программе «Ugene v. 40.1» и синтезировали в компании «Синтол». Для гена *inlA* использовали праймеры: InlA1 5'-gggtgaaaagtatactagtagc-3'; InlA2 5'-ggaagatattagcccaatttc-3', для гена *inlB*: InlBF 5'-gctatggatccataaattcaagaag, InlBR 5'-gaaaagctgcagaaaatccgccttc. Продукты амплификации выявляли методом гель-электрофореза. Целевые фрагменты ДНК очищали из геля с использованием набора «Dia-gene» («Диа-М»).

Таблица 1. Используемые штаммы *Listeria* spp.

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

Штамм Strain	Характеристика Characteristics	Источник Source	Ссылка Reference
<i>L. monocytogenes</i>			
<i>EGDe</i>	CC9	Типовой штамм Type strain	BIGSdb ID = 1
<i>EGDeΔinB</i>	<i>inB</i> deletion	Предоставлен профессором J. Vazquez Boland Kindly provided by Prof. J. Vazquez-Boland	
<i>EGDeΔinA</i>	<i>inA</i> deletion		
<i>VIMHA004</i>	CC2	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3449
<i>VIMHA007</i>	CC2	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3450
<i>VIMHA006</i>	CC2	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3606
<i>VIMHA009</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3452
<i>VIMHA011</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3454
<i>VIMHA010</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3453
<i>VIMHA012</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3607
<i>VIMHA017</i>	CC1	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3609
<i>L.mo25</i>	CC1	Курица Chicken	BIGSdb ID = 79358
<i>L.mo70</i>	CC8	Курица Chicken	BIGSdb ID = 78808
<i>L.mo78</i>	CC37	Курица Chicken	BIGSdb ID = 79363
<i>VIMPH006</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 3464
<i>L.mo71</i>	CC59	Курица Chicken	BIGSdb ID = 78809
<i>GIMC2010:LmcUH8</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 42978
<i>GIMC2032:LmcINH-1</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 45728
<i>GIMC2007:LmcIH1_3</i>	CC7	Носитель Carrier	BIGSdb ID = 42975
<i>766</i>	CC7	Свинья Swine	BIGSdb ID = 5803
<i>VIMPR134</i>	CC7	Грызун Rodent	BIGSdb ID = 3459
<i>VIMPR422</i>	CC7	Грызун Rodent	BIGSdb ID = 3460
<i>VIMPA064</i>	CC7	Новорождённый Newborn	BIGSdb ID = 3455
<i>L.mo84</i>	CC37	Мясо Meat	BIGSdb ID = 79367
<i>L.mo49</i>	CC9	Курица Chicken	BIGSdb ID = 79359
<i>L.mo129/3</i>	CC9	Молочные продукты Dairy products	BIGSdb ID = 78797
<i>L.mo75</i>	CC9		BIGSdb ID = 79362
<i>GIMC2035:Lmc7218</i>	CC9	Рыба Fish	BIGSdb ID = 45731
<i>GIMC2017: Lmc921</i>	CC9	Мясо Meat	BIGSdb ID = 42987
<i>L.mo98-20</i>	CC9	Молочные продукты Dairy products	BIGSdb ID = 78795
<i>LO28</i>	CC9	Типовой штамм Type strain	BIGSdb ID = 3364
<i>L. ivanovii</i>			
<i>ATCC 19119</i>		Типовой штамм Type strain	Американская коллекция типовых культур American Type Culture Collection

Секвенирование

Подготовку проб к секвенированию проводили согласно рекомендациям Центра коллективного пользования «Геном». Секвенирование ДНК выполняли с помощью набора реактивов «ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1» с последующим анализом продуктов реакции на

автоматическом секвенаторе «Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer». Для определения последовательностей генов были использованы праймеры: InlA1 5'-gggtgaaaagtatactagtagc-3', InlA2 5'-ggaagatattagcccaatttc-3', InlA-R 5'-cttctttgaattataggatccataagc-3', InlA3 5'-ccaatatcccggaagaaagctat-3', 5'-gcttatggatcctataattcaaaaagaag-3', InlBR 5'-gaaaagct-

gcagaaaatccgccttc-3', InlB1 5'-gaagcaggatcccggataactgcac-3', InlB2 5'-atagcgggtaagtgtgactgc-3'. Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программу «Ugene v. 40.1» и базу данных BigSdb-Pasteur¹.

Получение поликлональных моноспецифичных антител против InlA и InlB

Кроликов иммунизировали препаратами очищенных рекомбинантных белков InlA и InlB, как было описано ранее [19]. Работа с лабораторными животными проводилась с соблюдением этических принципов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 54 от 24.07.2023).

Глобулиновую фракцию гипериммунных сывороток осаждали, добавляя насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ («Русхим»). Выпавший осадок, содержащий IgG, растворяли в 0,01 М Na-фосфатном буфере pH 6,5 и диализовали против этого же буфера. Полученный раствор пропускали через колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50 и собирали фракцию IgG, выходящую в свободном объеме буфера. Аффинные антитела выделяли на колонке против соответствующих рекомбинантных белков InlA и InlB, иммобилизованных на активированной BrCN-сефарозе («GE Healthcare»). Фракцию, полученную после ДЭАЭ-хроматографии, промывали 0,3 М NaCl и элюировали 4,5 М MgCl_2 («Русхим»). Полученные образцы диализовали против фосфатно-солевого буфера («Sigma-Aldrich»), концентрировали, смешивали с глицерином до концентрации 50% и хранили при -20°C .

Вестерн-блот-анализ лизатов *L. monocytogenes*

Белки клеточной стенки получали из ночной культуры, выращенной в ВНИ-бульоне с добавлением 1% Amberlite XAD 4. Лизаты разделяли в 10% SDS-PAGE в денатурирующих условиях по Леммли и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad») с диаметром по 0,45 мкм. Нитроцеллюлозные мембраны инкубировали с полученными антителами против InlA или InlB соответственно

в разведении 1 : 10 000 в течение 1 ч. Далее мембрану отмывали 3 раза ТТБС буфером («Bio-Rad») и добавляли вторичные антитела против IgG кролика (в разведении 1 : 20 000). Визуализацию целевых белков InlA и InlB на мембране осуществляли добавлением ТМБ-субстрата («Thermo Fisher Scientific»). Для контроля нагрузки белков использовали антитела к GAPDH (в разведении 1 : 1000 («Thermo Fisher Scientific»)).

Непрямой иммуоферментный анализ

Бактериальные клетки культивировали в течение 24 ч на среде ВНИ, а затем центрифугировали и промывали трижды фосфатно-солевым буфером. Полученные образцы доводили до оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,2$. Чтобы проверить, что количество клеток совпадает, культуры высевали на агаризованную питательную среду. Лунки 96-луночного планшета покрывали аликвотами по 100 мкл соответствующих тестируемых штаммов *L. monocytogenes*. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 ч, далее трижды отмывали трис-буферным физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твин-20 (ТТБС) («Русхим»), а затем блокировали незанятые участки добавлением в лунки 200 мкл 2% бычьего сывороточного альбумина («Диа-М»), разведенного в фосфатно-солевом буфере в течение 30 мин. По окончании времени инкубации буфер для блокировки удаляли и добавляли 100 мкл анти-InlB или анти-InlA антител в разведении 1 : 4000 в ТТБС и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в режиме постоянного встряхивания при 140 об/мин. Далее лунки трижды промывали ТТБС и добавляли 100 мкл вторичных антител (козьи антитела против IgG кролика, меченные пероксидазой хрена, «Bio-Rad»), в ТТБС. После отмывали 6 раз ТТБС по 250 мкл и проявляли добавлением 100 мкл ТМБ-субстрата. Для остановки реакции использовали 100 мкл 2 М H_2SO_4 («Русхим»). Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на планшетном фотометре «iMark» («Bio-Rad»). Концентрацию InlA и InlB определяли по калибровочной кривой (рис. 1).

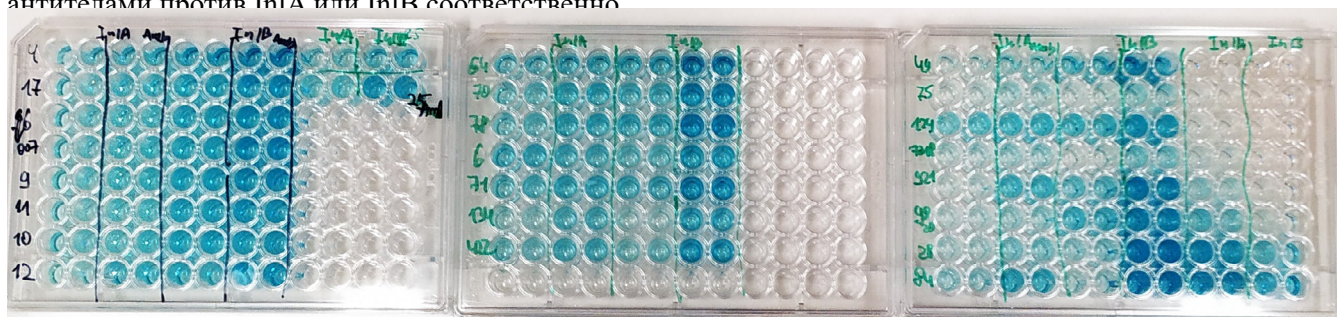


Рис. 1. 96-луночный планшет с результатами анализа.

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

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

Статистический анализ

Все эксперименты повторяли не менее 3 раз. Статистический анализ включал однофакторный ANOVA с тестом Тьюки. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Анализ частоты встречаемости изолятов, депонированных в базе данных BigSdb-Pasteur, в зависимости от филогенетического положения и региона выделения

В совокупности в базе данных BigSdb-Pasteur депонировано 111 изолятов, выделенных на территории России от сельскохозяйственных животных и человека, инфицированных *L. monocytogenes*. Из них 83 изолята были выделены в 1958–2019 гг. сотрудниками НИИЭМ им. Г.П. Сомова, ФИЦВиМ, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и ГНЦ ПМБ из клинического материала, полученного от мертворождённых в результате перинатального листериоза детей, а также от беременных женщин без клинических признаков инфекции, и из образцов, забранных у пациентов с нейрوليшериозом и поражениями тканей лёгкого. Анализ базы данных показал, что в случаях листериоза человека преобладали изоляты, принадлежащие к СС7 (II филогенетическая линия), СС1 и СС2 (I филогенетическая линия) по 16, 11 и 8% соответственно. Изоляты, относящиеся к СС9 (II филогенетическая линия), составили 2% (рис. 2).

Далее мы проанализировали распределение в соответствии с СС для изолятов, выделенных на территории Европы (исключая страны, входившие в состав СССР) из клинического материала пациентов с листериозом. Всего в базе депонировано 747 изолятов. При этом 723 изолята представлены теми же клональными комплексами, что и на территории России. Однако процентное соотношение представленности отдельных СС среди клинических изолятов, выделенных на территории Европы, отличалось от российских. Среди европейских изолятов преобладали СС1, СС6 и СС2 (23, 15 и 14% соответственно).

Определение разнообразия *inlA* и *inlB* среди изолятов *L. monocytogenes*, выделенных на территории России, из коллекции НИЦЭМ им. Гамалеи

Анализ базы данных показал, что среди штаммов II филогенетической линии, преобладающих на территории России, штаммы, относящиеся к СС7, чаще встречаются среди клинических изолятов, по сравнению со штаммами, относящимися к СС9. Для понимания потенциальных механизмов, обеспечивающих эти различия, мы просеквенировали гены *inlA* и *inlB* 32 штаммов, принадлежащих к данным СС, которые были выделены на территории России.

Среди штаммов, принадлежащих к СС7, выявлены 3 аллельных варианта *inlA*, в том числе 15 штаммов обладали аллелем 2 гена *inlA*, пред-

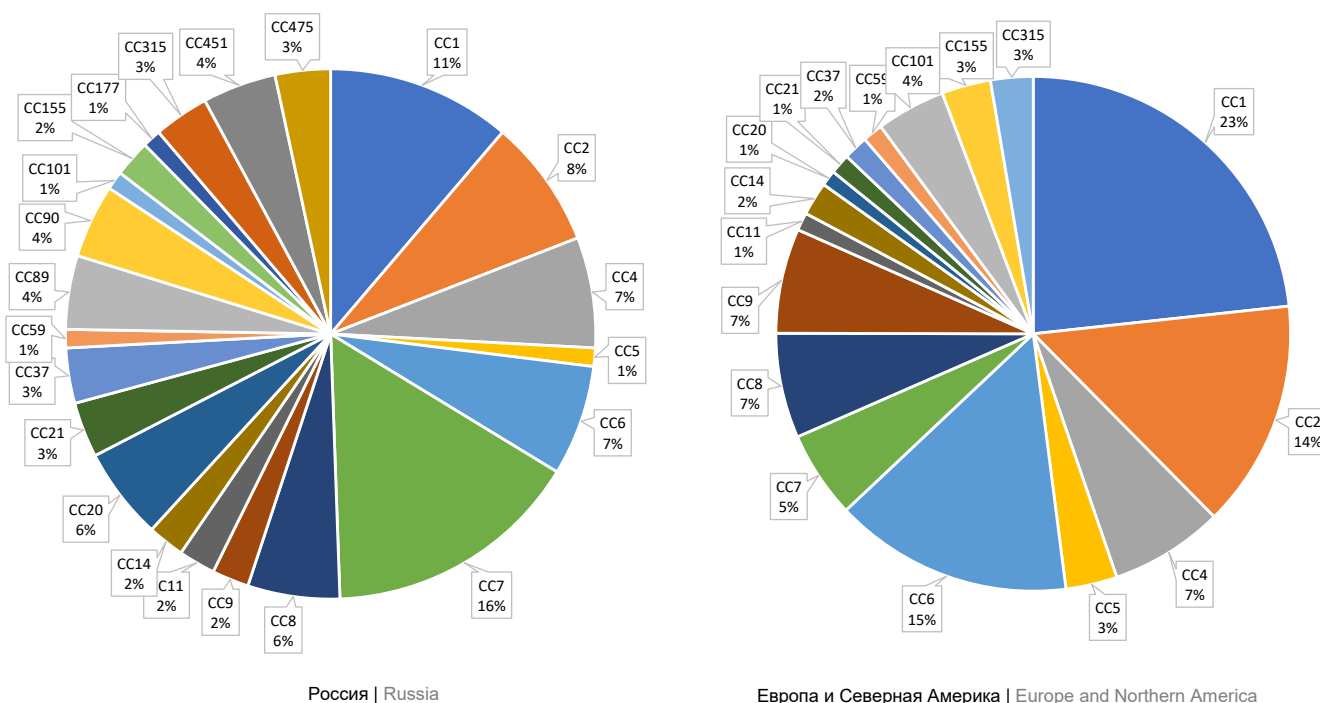


Рис. 2. Частота встречаемости СС среди штаммов *L. monocytogenes*, информация о которых хранится в базе данных ListiList (Institut Pasteur, Франция), для России и стран Европы и Северной Америки.

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

ставленным в базе данных BigSdb-Pasteur. Однако у 2 штаммов *inlA* отличался от аллелей, депонированных в этой базе данных. Выявленные мутации были несинонимическими, что указывало на потенциальное функциональное значение замен. Изолят VIMPA064 содержал 1 несинонимическую замену, приводящую к замене глутамина в 364-м положении на пролин в области интерналинового домена, вовлечённого в белок-белковое взаимодействие с эукариотическим рецептором E-кадгеринном. VIMPH006 содержал 3 несинонимические замены в положениях 618, 620 и 621 (пролин, лизин и глутамин вместо аланина, глутамина и серина) вне области интерналинового домена. Ни один из аллелей штаммов, относящихся к CC7, не содержал преждевременных стоп-кодонов.

Из 9 штаммов, принадлежащих к CC9, у 1 штамма выявили наличие стоп-кодона в гене *inlA*. Стоп-кодон находился вне области интерналинового домена, однако препятствовал формированию полноразмерного белка, в частности, связыванию белка с поверхностью бактерии, что необходимо для функциональной активности InlA как фактора инвазии. Остальные 8 штаммов CC9 кодировали полноразмерный вариант *inlA* относящийся к аллелю 1. Данные о последовательностях генов *inlA* доступны в базе данных GenBank под номерами OQ865090–OQ865119.

Секвенирование гена *inlB* у 32 штаммов не выявило особенностей в пределах клональных комплексов. Для штаммов, относящихся к CC7, был выявлен аллель 2, к CC9 — аллель 1.

Таким образом, анализируя последовательности *inlA* и *inlB*, у штаммов, относящихся к CC7 и

CC9, установлена внутриклональная варибельность *inlA*, в то время как *inlB* был консервативен для всех штаммов, относящихся к определённому клону. Аллели, выявленные среди штаммов высоковирулентного CC7, кодировали различные изоформы InlA, что может указывать на различия в их взаимодействии с таргетным рецептором на поверхности клеток человека. Вариант, кодируемый альтернативным аллелем *inlA*, выявленным среди штаммов, относящихся к редко встречающемуся среди клинических изолятов CC9, кодировал нефункциональный укороченный белок.

Уровень экспрессии фактора патогенности *L. monocytogenes* InlB в штаммах CC1, CC2, CC7 и CC9

Для оценки корреляции между уровнем продукции факторов инвазии InlA и InlB и частотой встречаемости штаммов данного CC среди клинических изолятов были сконструированы 2 тест-системы, основанные на ИФА. Концентрацию белков определяли по калибровочным кривым от 5 до 1000 нг/мл. В качестве стандартов использовали рекомбинантные InlA и InlB (рис. 3).

Транскрипция обоих генов, кодирующих белки InlA и InlB, находится под контролем регулятора PrfA [12]. При культивировании *L. monocytogenes* на питательных средах активность PrfA увеличивается в присутствии гидрофобных адсорбентов (активированный уголь или Amberlite XAD4), достигая уровней, характерных для бактерий в процессе инфекции [18]. С целью изучения изменений в концентрации инвазинов в зависимости от состо-

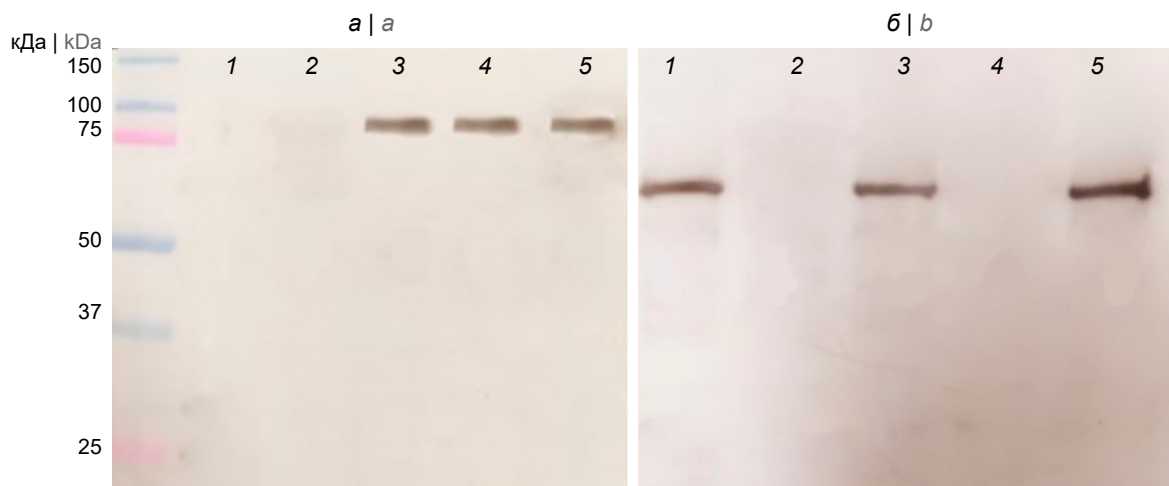


Рис. 3. Иммуноблот клеточных лизатов бактерий *Listeria* spp.

a — моноспецифические антитела против InlA; *b* — моноспецифические антитела против 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).

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)

яния PrfA были измерены уровни InlA и InlB без активации и при активации PrfA регулона в зависимости от наличия в питательной среде адсорбента Amberlite XAD4. Без активации PrfA уровень InlA у штаммов *L. monocytogenes* варьировал от 5 до 65 нг/мл (рис. 4). При этом штаммы, относящиеся к CC1, CC2 и CC7, показывали в среднем более высокий уровень InlA в сравнении со штаммами, относящимися к CC9 (53,5 ± 5,3 нг/мл против 21,1 ± 3,2 нг/мл; $p < 0,05$). Исключение составил 1 штамм CC9 L.mo129-3, имеющий уровень, сравнимый со штаммами CC1, CC2, CC7 (59,1 ± 1,5 нг/мл).

Комплементация питательной среды адсорбентом Amberlite XAD4 и соответствующая активация PrfA приводила к увеличению концентрации InlA у всех штаммов в среднем на 31%. При этом у отдельных штаммов концентрация достигала максимума: VIMHA017 (CC1) — 99 нг/мл, VIMHA007 (CC2) — 93 нг/мл, L.mo71 — 107 нг/мл (CC7), L.mo129-3 (CC9) — 90 нг/мл.

Уровень InlB между штаммами варьировал от 15 до 958 нг/мл без активации PrfA регулона (рис. 5). При этом в среднем концентрация у штаммов CC1 и CC2 составляла 740,5 нг/мл, что было существенно

выше, чем у штаммов CC7 и CC9 (209,5 и 177,9 нг/мл соответственно). Но в сравнении с InlA уровень InlB у штамма L.mo129-3 не достигал значений, характерных для штаммов CC1 и CC2, и был меньше в 2 раза ($p < 0,05$).

При активации PrfA концентрация InlB достигала максимальных значений 1353 нг/мл для штаммов CC1 и CC2, 917 нг/мл — для CC7, 835 нг/мл — для CC9. При этом наибольшего увеличения уровня InlB достигала у штаммов CC7 (в 3,29 раза в сравнении с уровнем без активации). Для штаммов CC9 и I филогенетической линии (CC1, CC2) увеличение уровня InlB в присутствии адсорбента составило 2,93 и 1,54 раза соответственно.

Обсуждение

У *L. monocytogenes*, как и у большинства других патогенных бактерий, клональные группы и линии различаются по вирулентному потенциалу [20, 21]. Например, штаммы II филогенетической линии чаще связаны с пищевыми продуктами, в то время как штаммы I филогенетической линии чаще обнаруживаются в клинических изолятах. Однако даже внутри филогенетических линий распределение

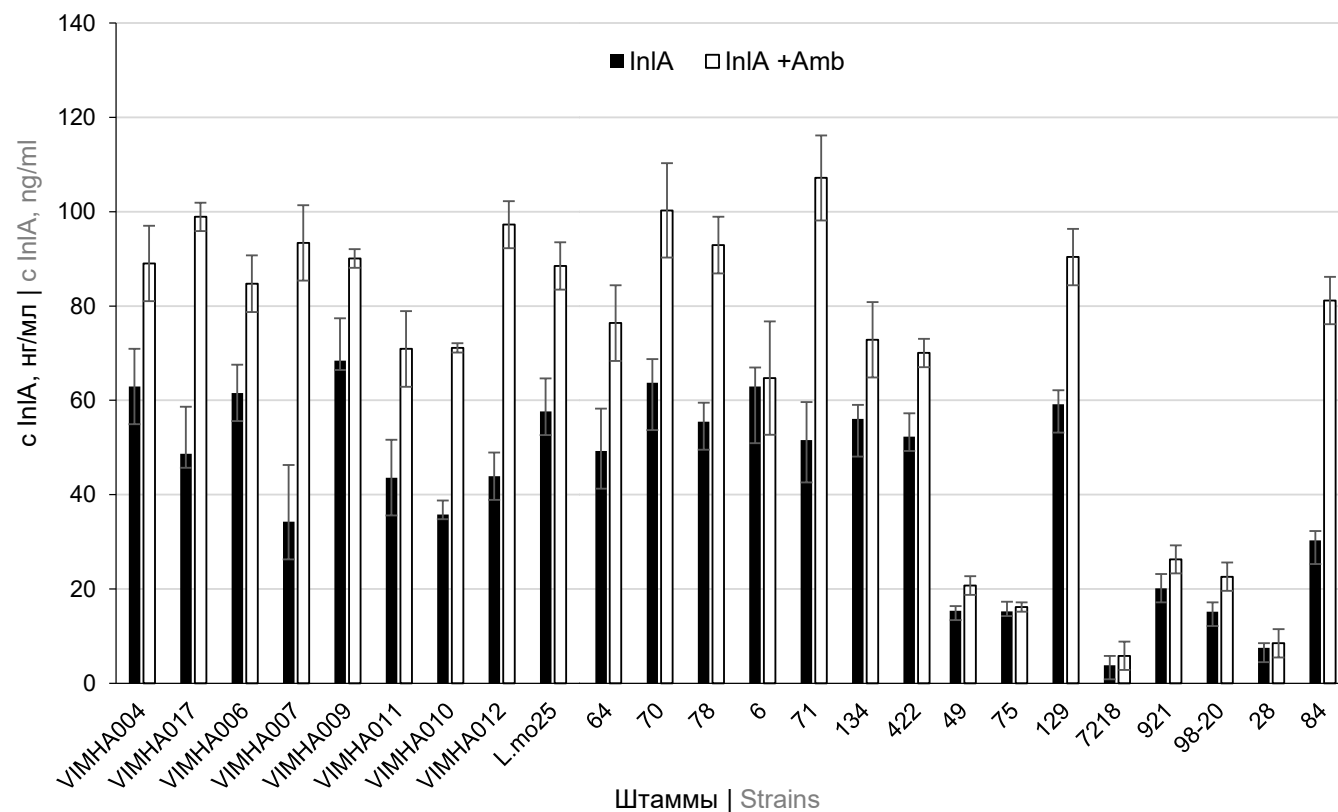


Рис. 4. Уровни InlA изолятов, относящихся к разным CC.

Концентрацию InlA измеряли при помощи разработанной ИФА-тест-системы. Бактерии выращивали в среде BHI без и с добавлением 1% Amberlite XAD4.

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

The InlA 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.

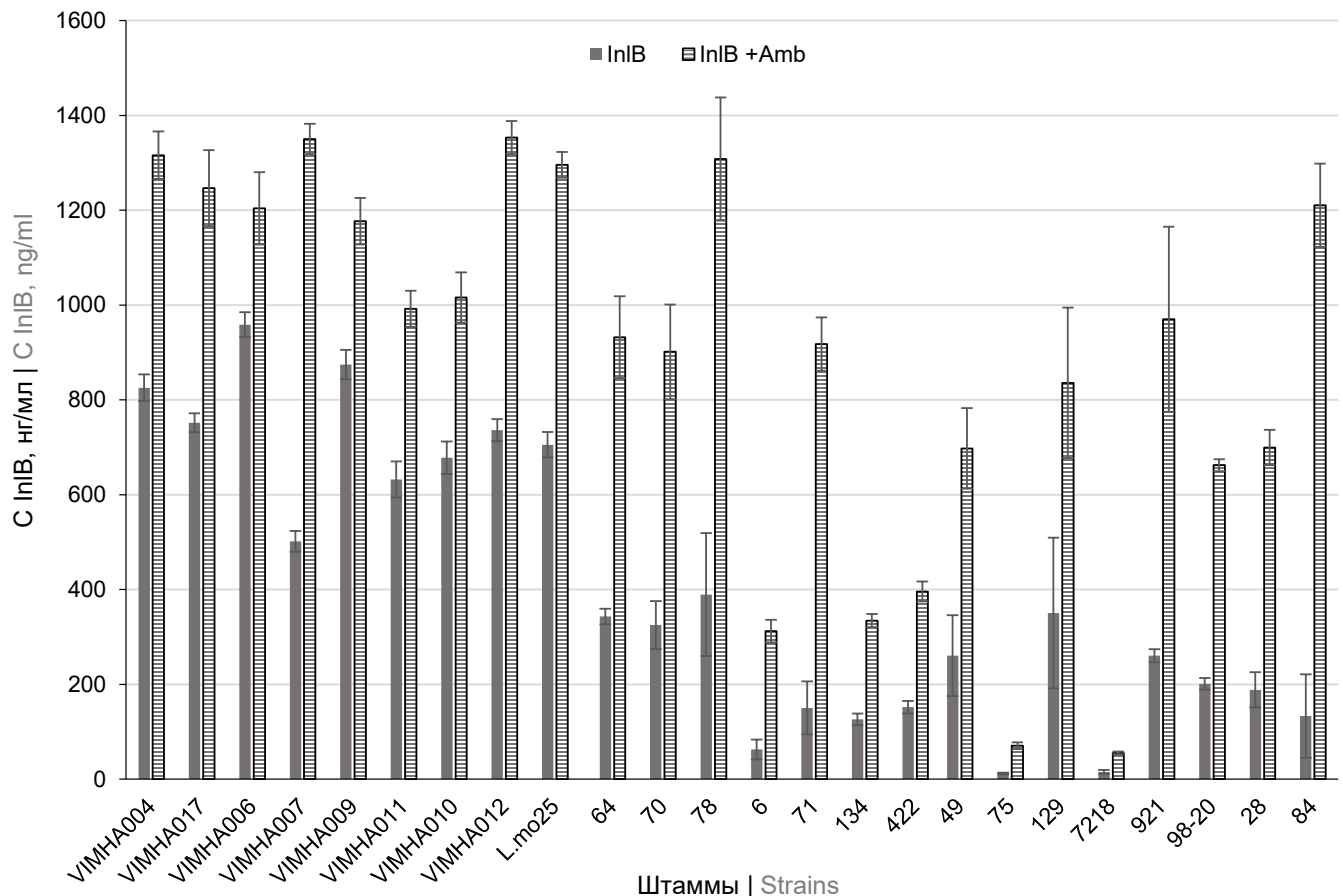


Рис. 5. Уровни InIB изолятов, относящихся к разным СС.

Концентрацию InIA измеряли при помощи разработанной ИФА-тест-системы. Бактерии выращивали в среде BHI без и с добавлением 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.

среди источников различное. Например, штаммы II филогенетической линии, принадлежащие к СС7, чаще, чем штаммы, относящиеся к СС9, выделяют из клинических образцов [20]. Установление природы такой гетерогенности необходимо для понимания механизмов эволюции и формирования высоковирулентных штаммов.

Для ряда патогенных бактерий, например для энтеропатогенных иерсиний, различия в вирулентности связаны с наличием дополнительных факторов патогенности, которые могут присутствовать на плазидах и мобильных генетических элементах [22]. При поиске дополнительных факторов патогенности у штаммов *L. monocytogenes*, относящихся к клональному комплексу СС1, был обнаружен бактериоцин LLS, который, предположительно, позволяет листериям дольше выживать в присутствии нормальной микрофлоры, однако не является полноценным фактором патогенности и отсутствует у других высоковирулентных штаммов, относящихся к другим СС [23].

Нами была предложена альтернативная гипотеза о роли варибельности основных факторов патогенности как основного механизма формирования высоковирулентных штаммов *L. monocytogenes* и других возбудителей сапронозов [24]. Природные изоформы InIB отличаются между собой и по кинетике активации внутриклеточных сигнальных путей, и по константе связывания со своими целевыми рецепторами с-Met и gC1qR [25, 26]. Штаммы, отличающиеся только изоформой InIB, различались в способности поддерживать гастроинтестинальную инфекцию у мышевидных грызунов, а изоформы InIB обуславливали различную инвазию данных штаммов в эпителиальные клетки животных (клетки почки овцы, shKEC) [10]. В данной работе продемонстрирована варибельность другого фактора инвазии — белка InIA среди штаммов, относящихся к СС II филогенетической линии: СС7 и СС9. Среди проанализированных штаммов выявлен один нефункциональный белок InIA, что соответствует относительно низкой роли СС9 в клиническом рас-

пространении листериоза и совпадает с данными других авторов [27].

Ещё одним механизмом, определяющим вирулентный потенциал штамма, может быть уровень продукции основных факторов патогенности [11]. Ранее было установлено, что уровень продукции InlB влияет на взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами [28]. У *L. monocytogenes* продукция факторов патогенности происходит под положительным контролем белка PrfA, который неактивен в условиях роста, свидетельствующих о пребывании вне организма хозяина (низкая температура, наличие растительных сахаров и гидрофобных пептидов) [22]. Данный механизм регуляции является оправданным, поскольку позволяет исключить избыточность синтеза факторов патогенности для возбудителей сапронозов, когда они обитают в абиотических условиях окружающей среды. Вместе с тем высокий уровень продукции факторов, необходимых для пересечения эпителиального барьера кишечника, должен положительно влиять на вирулентность бактерий. В соответствии с этой гипотезой в данном исследовании показано, что уровень продукции фактора инвазии InlB без активации PrfA был выше в 4 раза у штаммов I филогенетической линии (CC1 и CC2) в сравнении со штаммами II филогенетической линии (CC7, CC9). Уровень продукции InlA без активации PrfA и в условиях активации PrfA у изолятов, относящихся к CC1, CC2, CC7, был выше, чем у изолятов, относящихся к CC9. Это согласуется с тем, что наиболее часто на территории России в клинических образцах встречаются именно CC1, CC2, CC7. При этом у штаммов, относящихся к CC9, которые чаще выделяют из продуктов питания, уровень InlA был ниже в 2,5 раза, за исключением штамма L.mo129-3, который показал схожую с CC1 и CC2 концентрацию.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что высоковирулентные штаммы для человека характеризуются не только определёнными изоформами, но и повышенной продукцией InlA и InlB. Наши данные подтверждают результаты других исследователей, которые установили, что клинические изоляты отличаются от пищевых изолятов уровнем экспрессии *inlA* [11].

Заключение

В совокупности полученные нами данные согласуются с эпидемиологическими наблюдениями и раскрывают возможные механизмы формирования CC *L. monocytogenes* с различными вирулентными потенциалами. Полученные результаты имеют фундаментальное значение, но также могут послужить основой для классификации вновь выделенных изолятов на вирулентные и гиповирулентные клоны.

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., Pouseele 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. Вариабельность 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 Российской государственной медицинской академии* 2022;(3):5–10. DOI: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2022.034>
Chalenko Y.M., Abdulkadiev 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>

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

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



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 пенемам 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. Исследование проведено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021-2025 гг. (№ НИОКТР АААА-А21-121011990054-5).

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>

Original Study Article

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

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 (AMA), 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>

Введение

Нетифоидные штаммы *Salmonella enterica* подвид *enterica* (в дальнейшем именуемые в нашем исследовании, как нетифоидные *Salmonella* или нетифоидные сальмонеллы) вносят значительный вклад в заболеваемость кишечными инфекциями в мире [1, 2] и отвечают за 99% случаев сальмонеллёза у людей и животных и сохраняет свою актуальность при формировании вспышечной заболеваемости,

занимая 3-е место (после острой кишечной инфекции вирусной этиологии) по числу очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи инфекции. Несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости в последние годы, сальмонеллёз по-прежнему является наиболее часто регистрируемым пищевым зоонозом в России. По оценке динамики заболеваемости на территории России с 2019 по 2021 г. показатель заболева-

емости уменьшился в 1,8 раза и составил 13,61 на 100 тыс. населения, в то время как в 2022 г. — 17,1 на 100 тыс. населения¹.

Сальмонеллёз неосложнённого течения, как правило, не требует антибактериальной терапии², но она показана для лечения инвазивных и тяжёлых форм, а также пациентов, входящих в группу риска (дети грудного возраста, пожилые люди и пациенты с ослабленным иммунитетом) [3, 4]. Длительное время препаратами выбора являлись хлорамфеникол, ампициллин, триметоприм-сульфаметоксазол [5, 6], однако в последние годы устойчивость к этим препаратам значительно возросла [7].

В настоящее время рекомендуемыми препаратами выбора в терапии тяжёлых и генерализованных форм сальмонеллёза являются цефалоспорины III поколения и фторхинолоны^{3,4}. Эти антимикробные препараты (АМП) входят в список обязательных для мониторинга для сальмонелл по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения. По данным последнего отчёта Глобальной системы надзора за устойчивостью к АМП и их использованием, процент устойчивых к ципрофлоксацину штаммов сальмонелл, выделенных от людей, увеличился с 12,0% в 2017 г. до 19,7% в 2020 г.⁵ В то же время процент выявляемости штаммов-продуцентов β-лактамаз расширенного спектра действия, хотя и остаётся на низком уровне, имеет тенденцию к росту [8].

Мониторинг циркулирующих штаммов и определение их профиля устойчивости к АМП необходимы для лучшего понимания эпидемиологической ситуации, выработки национальных стратегий по искоренению резистентных штаммов, а также разработки профилактических мер по недопущению формирования резервуаров инфекции. При этом организация мониторинга должна основываться на принципе «Единое здоровье», который заключается в тесном взаимодействии и координации разных сфер, в частности организации мониторинга фенотипических и молекулярно-генетических характеристик сальмонелл как в популяции человека, так и в разных отраслях сельского хозяйства, что особенно актуально для обеспечения безопасности пищевых продуктов [9].

¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.; 2023.

² Plumb I., Fields P., Bruce B.B. Salmonellosis (Nontyphoidal) // CDC Yellow Book; 2024. Travel-Related Infectious Diseases. URL: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/salmonellosis-nontyphoidal> (дата обращения 07.09.2023).

³ Клинические рекомендации. Сальмонеллез у взрослых. М.; 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.

Сравнительный анализ данных по антибиотикорезистентности сальмонелл, полученных в России в разные годы, представляет определённые сложности. Одной из главных причин является постоянная изменчивость критериев интерпретации и методических подходов к тестированию на антибиотикорезистентность. Эти изменения происходят во всём мире, что усложняет проведение объективного анализа [10]. Согласно предыдущим исследованиям, процент нетифоидных штаммов *Salmonella*, устойчивых к различным классам АМП, в разные годы на отдельных территориях России значительно варьировал. Резистентность к аминогликозидам проявляли от 1–2 до 53,1% штаммов, к хинолонам — от 0,0 до 59,2%, к пенициллинам — от 26,4 до 42,0% [11–14]. Другим немаловажным фактором является ограниченное число исследований в России, отражающих комплексный анализ фенотипической резистентности штаммов нетифоидных сальмонелл с точки зрения разнообразия источников и географии изоляции, а также серотипового пейзажа.

Цель настоящей работы заключалась в оценке фенотипической резистентности сальмонелл к различным классам АМП и определение связи между фенотипической резистентностью и такими параметрами, как серотип, источник изоляции и характер заболеваемости (групповая и спорадическая), при которой были изолированы штаммы.

Материалы и методы

Отбор изолятов и микробиологические исследования

В 2019–2022 гг. проведено исследование 2494 штаммов нетифоидных сальмонелл, выделенных на территории 59 регионов России из различных источников. Среди них 1355 изолятов были получены в ходе расследования 113 случаев групповой заболеваемости сальмонеллёзами от людей и предполагаемых факторов передачи инфекции (пищевые продукты и окружающая среда), 1139 изолятов выделены при единичных случаях заболеваний сальмонеллёзами из пищевых продуктов и окружающей среды. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 83 от 26.06.2018).

Исследуемые штаммы предварительно рассевали до получения отдельных колоний на среде МакКонки («CONDA Pronadisa»). Видовая принадлежность была установлена с использованием биохимических идентификационных систем «API 20E» («bioMérieux»).

Серологическая идентификация

Серологическую идентификацию сальмонелл проводили с помощью унифицированных мето-

дов по схеме Кауфмана–Уайта с использованием диагностических поликлональных сывороток («ПЕТСАЛ») и моноклональных сывороток («Sifin»). Названия серотипов указаны в сокращенном варианте написания согласно международным правилам. Вместо названия с указанием таксономической принадлежности к роду, виду, подвиду и серотипу, например, *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Enteritidis, в статье используется сокращенный вариант названия серотипа — S. Enteritidis.

Субвидовое генетическое типирование

Субвидовое типирование проводили согласно международному стандартизованному протоколу с использованием ферментов рестрикции *XbaI* и *BlnI* [15].

Определение фенотипической резистентности

Среди всех проанализированных штаммов ($n = 2494$) у 1522 изолятов (61,0%; 95% доверительный интервал (ДИ) 59,1–62,9) определили чувствительность к АМП (729 штаммов из очагов групповой заболеваемости и 793 — спорадические случаи выявления сальмонелл) методом серийных разведений в бульоне путём определения минимальной подавляющей концентрации антибиотика на планшетах G-I и G-II «MikrolatestSensiLaTest MIC» («Erba Lachema»). В качестве контрольного штамма использовали штамм *Escherichia coli* (ATCC 25922). Спектр АМП по классам, согласно классификации Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI)⁶, включал:

- пенициллины: ампициллин, пиперациллин;
- β-лактамы комбинированные препараты: ампициллин/сульбактам, пиперациллин/тазобактам;
- цефемы: цефазолин, цефуроксим, цефотаксим, цефтазидим, цефепим;
- монобактамы: азтреонам;
- пенымы: меропенем, эртапенем;
- аминогликозиды: гентамицин, нетилмицин, амикацин, тобрамицин;
- липопептиды: колистин;
- антагонисты фолатного пути: триметоприм/сульфаметоксазол;
- хинолоны: ципрофлоксацин;
- фениколы: хлорамфеникол;
- тетрациклины: тетрациклин, тигециклин.

Результаты определения чувствительности интерпретировали в соответствии с актуальными критериями Европейского комитета по определению чувствительности к АМП («EUCAST v. 13.0»). Если

у штамма проявлялась устойчивость к хотя бы одному антибиотику определённого класса, то штамм считался устойчивым к этому классу АМП.

Из-за отсутствия интерпретации минимальной подавляющей концентрации для *Salmonella* цефазолина, цефуроксима, нетилмицина и тигециклина данные по этим препаратам в исследовании не учитывали. Интерпретацию по тетрациклину и хлорамфениколу оценивали по «эпидемиологическим точкам отсечения» (epidemiological cut-off values — ECOFF). Кроме того, по рекомендации Всемирной организации здравоохранения для колистина было установлено значение ECOFF > 8 мкг/мл при тестировании штаммов сальмонелл, принадлежащих к серотипам S. Enteritidis и S. Dublin⁷.

Стратегия определения выборки неповторяющихся штаммов и оценка разнообразия профилей резистентности

Неповторяющимися штаммами считались те штаммы, которые характеризуются уникальным сочетанием таких характеристик, как серотип, дата изоляции, место выделения, источник выделения, профиль устойчивости к АМП и генетический субтип. При этом каждый очаг групповой заболеваемости, независимо от источника выделения, был представлен одним штаммом или несколькими штаммами, если внутри очага были выявлены штаммы, отличающиеся по одной или нескольким характеристикам. Если для штамма отсутствовал генетический субтип, то он не учитывался в спектре характеристик.

Для анализа разнообразия профилей резистентности штаммов *Salmonella* мы использовали индекс разнообразия Шеннона (H). Оценку достоверности различия значений индекса Шеннона (p -уровень значимости) между двумя группами штаммов, каждая из которых характеризовалась набором профилей резистентности с определёнными частотами встречаемости, проводили с использованием модифицированного параметрического критерия Стьюдента — t -теста Хатченсона [16].

95% ДИ для доли обнаруживаемых штаммов согласно различным критериям был рассчитан по функции «ViomCI» по методу Уилсона с использованием пакета библиотек «DescTools» программно-обеспечения R.

Результаты

Закономерности и характеристика резистентности сальмонелл, циркулирующих на территории России

Среди 1522 изолятов, исследованных на антибиотикочувствительность в 2019–2022 гг., были

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.

Таблица 1. Распределение серотипов *S. enterica* в очагах группой заболеваемости и при спорадических случаях изоляции сальмонелл

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

Серотип (число очагов) Serotype (number of outbreaks)	Число штаммов Number of strains	Доля штаммов, % Percentage of strains, %	95% ДИ 95% CI
Групповая заболеваемость 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	
Спорадические случаи выделения штаммов сальмонелл Sporadic cases of <i>Salmonella</i> strains isolation			
Спорадическая заболеваемость 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
Пищевые продукты 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
Внешняя среда 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
Всего Total	599		

отобраны 752 неповторяющихся штамма, принадлежащих к 69 серотипам. Из них 153 штамма относились к очагам групповой заболеваемости и включали штаммы сальмонелл, выделенные как от людей (*n* = 121), так и из предполагаемых источников (*n* = 32), а 599 штаммов — к спорадическим случаям выявления сальмонелл (табл. 1). Спорадические штаммы были подразделены на три группы по источникам выделения: спорадическая заболеваемость — штаммы, выделенные от людей (*n* = 270), из пищевых продуктов (*n* = 239) и окружающей среды — из различных водоёмов и сточных вод (*n* = 90).

Устойчивость по меньшей мере к одному из тестируемых антибиотиков проявляли 543 (72,2%) штамма, а 193 (25,7%) штамма характеризовались множественной лекарственной устойчивостью

(МЛУ). Основная часть штаммов с МЛУ-фенотипом (*n* = 120) была резистентна к 4–6 классам АМП, а 6 штаммов характеризовались максимальным спектром резистентности — 10 классов АМП из 11 тестируемых (см. Приложение в дополнительных файлах к статье на сайте журнала: DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-451-1>).

Процент устойчивых штаммов всей выборки исследованных сальмонелл к определённым классам АМП характеризовался следующим распределением: фенотипическую резистентность к хинолонам проявляли 61,3% (95% ДИ 57,8–64,7) исследованных штаммов, к тетрациклинам — 28,1% (95% ДИ 25,0–31,4), к пеницилинам — 19,1% (95% ДИ 16,5–22,1), к β-лактамным комбинированным препаратам — 18,6% (95% ДИ 16,0–21,6), к антагонистам фолатного пути — 16,5% (95% ДИ 14,0–19,3),

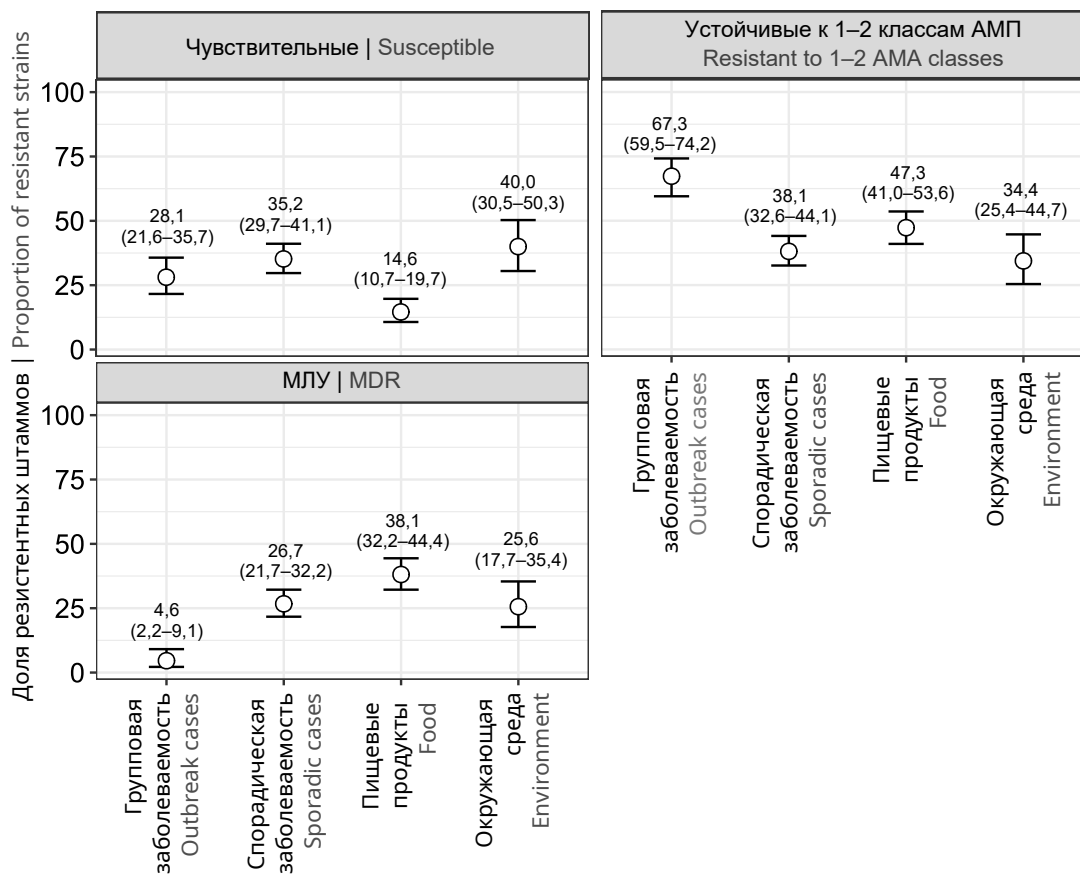


Рис. 1. Доля резистентных штаммов *Salmonella* (с указанием 95% ДИ), выделенных из различных источников и чувствительных ко всем АМП, устойчивых к 1–2 классам АМП, устойчивых к 3 и более классам АМП (МЛУ).

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).

к фениколам — 10,1% (95% ДИ 8,2–12,5), к аминогликозидам — 5,6% (95% ДИ 4,2–7,5), к цефемам — 4,7% (95% ДИ 3,5–6,6), к монобактамам — 4,4% (95% ДИ 3,1–6,1), к липопептидам — 3,9% (95% ДИ 2,8–5,6). Резистентных штаммов к пеницемам не выявлено.

Штаммы ($n = 153$) из 113 очагов групповой заболеваемости сальмонеллезами распределились следующим образом: в 2019 г. — 53; в 2020 г. — 15; в 2021 г. — 17; в 2022 г. — 28. Для 77 (68,1%) вспышек был характерен только 1 неповторяющийся штамм. В остальных случаях в очагах обнаружено 2–4 неповторяющихся штамма. Лидирующим серотипом очагов групповой заболеваемости являлся *S. Enteritidis* ($n = 138$). В свою очередь серотипы *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Muenchen*, *S. Abony*, *S. Stanley*, *S. Braenderup* и *S. Vareilly* относились к единичным вспышкам. Наибольшая доля (67,3%; 95% ДИ 59,5–74,2) штаммов проявляла устойчивость к 1–2 классам АМП (рис. 1). Чувствительные ко всем исследованным АМП штаммы составляли 28,1% (95% ДИ 21,6–35,7), в то время как доля штаммов с МЛУ составила всего 4,6% (95% ДИ 2,2–9,1).

Изоляты, выделенные от людей, а также из других источников, по эпидемиологическим данным не связанных со случаями групповой заболеваемости сальмонеллезами, были представлены 599 штаммами. Для каждого источника выделения были характерны свои доминирующие серотипы. Среди спорадической заболеваемости преобладающим был *S. Enteritidis* (20,4%; 95% ДИ 16,0–25,6), для пищевых продуктов и окружающей среды — *S. Infantis* (39,7%; 95% ДИ 33,8–46,1 и 14,4%; 95% ДИ 8,6–23,2). При этом к часто встречающимся серотипам также относился *S. Typhimurium* (табл. 1).

Необходимо отметить, что среди штаммов при спорадической заболеваемости и выделенных из окружающей среды были приблизительно равные доли чувствительных к АМП (35,2%; 95% ДИ 29,7–41,1 и 40%; 95% ДИ 30,5–50,3), устойчивых к 1–2 классам АМП (38,1%; 95% ДИ 32,6–44,1 и 34,4%; 95% ДИ 25,4–44,7) и штаммов с МЛУ-профилем (26,7%; 95% ДИ 21,7–32,2 и 25,6%; 95% ДИ 17,7–35,4). Сальмонеллы, выделенные из пищевых продуктов, характеризовались наиболее высокой долей МЛУ-фенотипов (38,1%; 95% ДИ 32,6–44,1) и

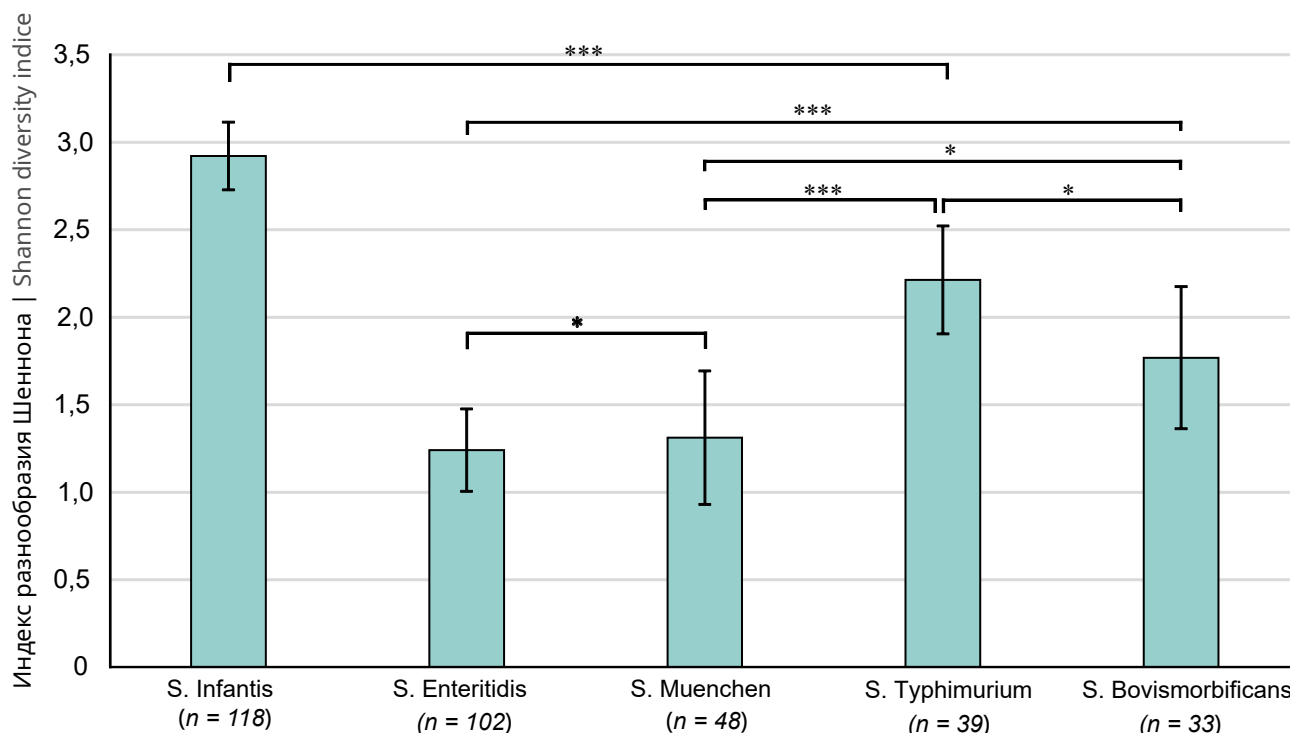


Рис. 2. Распределение индексов разнообразия Шеннона (с указанием 95% ДИ) для серотипов сальмонелл, не связанных с очагами групповой заболеваемости, с наибольшим числом профилей резистентности.

* — незначительно отличаются по разнообразию ($p > 0,05$); *** — достоверное отличие ($p < 0,05$).

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 ($p < 0.05$).

самой низкой долей (14,6%; 95% ДИ 10,7–19,7) чувствительных штаммов в сравнении с другими источниками (рис. 1). Кроме того, штаммы, не связанные с групповой заболеваемостью, характеризовались высоким разнообразием профилей антибиотикорезистентности. Нами было выявлено 85 различных профилей. Наибольшим числом профилей обладали часто встречающиеся серотипы: S. Enteritidis ($n = 11$), S. Infantis ($n = 31$), S. Muenchen ($n = 10$), S. Typhimurium ($n = 14$) и S. Bovismorbificans ($n = 11$).

Сопоставление индексов разнообразия Шеннона (H) по профилям антибиотикорезистентности часто встречающихся серотипов сальмонелл, не относящихся к групповой заболеваемости, и оценка достоверностей различий показали, что разнообразие у штаммов S. Infantis было достоверно выше, чем у штаммов S. Typhimurium ($p < 0,05$; рис. 2). При этом S. Typhimurium по разнообразию профилей резистентности не отличался от S. Bovismorbificans ($p > 0,05$), но имел достоверно ($p < 0,05$) более высокое разнообразие, чем S. Muenchen. В свою очередь, разнообразие для S. Bovismorbificans показало незначительное отличие от S. Muenchen ($p > 0,05$), но было достоверно ($p < 0,05$) выше по сравнению с разнообразием S. Enteritidis. При этом S. Muenchen и S. Enteritidis не различались по разнообразию

($p > 0,05$). Таким образом, S. Infantis обладал самым высоким разнообразием профилей антибиотикорезистентности ($H = 2,89$; 95% ДИ 2,70–3,08) по сравнению с другими серотипами. В то же время S. Enteritidis обладал самым низким разнообразием ($H = 1,24$; 95% ДИ 1,01–1,46), несмотря на 2-е место по количеству штаммов, выделенных при спорадических случаях, наряду с S. Muenchen.

Сравнительная оценка фенотипической резистентности штаммов сальмонелл к классам АМП, выделенных из различных источников

Для штаммов из всех источников была характерна низкая устойчивость к аминогликозидам, липопептидам и фениколам, в то время как значительная часть штаммов характеризовалась высокими показателями устойчивости к хинолонам (рис. 3).

Анализируя частоту выявленных резистентных штаммов среди различных источников выделения относительно определённых классов АМП, можно увидеть, что, доля штаммов, устойчивых к пенициллинам, β -лактамным комбинированным препаратам, цефемам, монобактамам, антагонистам фолатного пути и тетрациклинам была значительно выше или, в случае цефемов и монобактамов, обнаруживалась только в группе источников: «спорадическая забо-

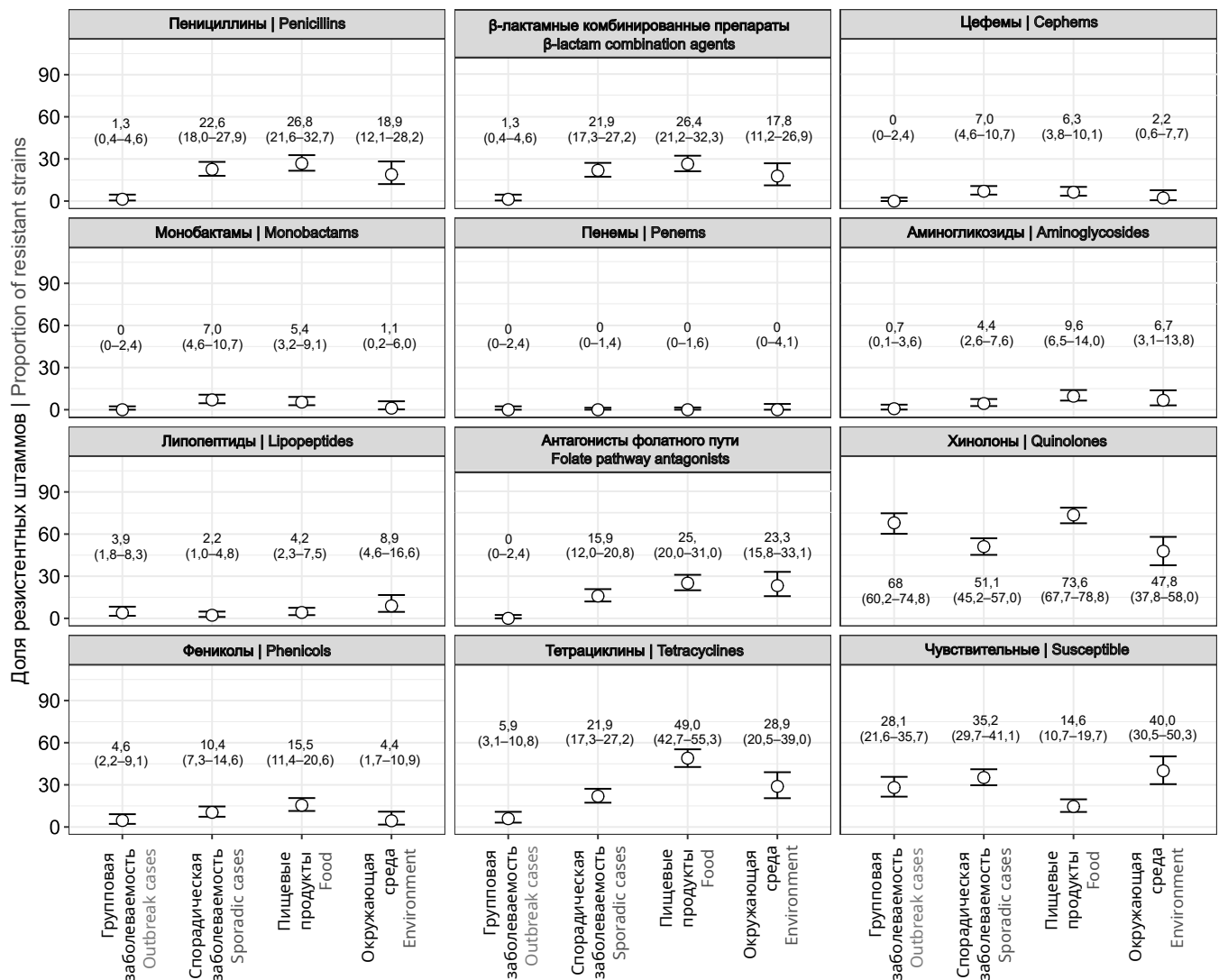


Рис. 3. Доля резистентных штаммов *Salmonella* (с указанием 95% ДИ) к различным классам противомикробных препаратов из различных источников выделения.

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

леваемость», «пищевые продукты», «окружающая среда» по сравнению со штаммами, выделенными при групповой заболеваемости (рис. 3).

Наиболее высокий показатель резистентности к тетрациклинам (49,0%; 95% ДИ 42,7–55,3) относился к штаммам, выделенным из пищевых продуктов.

Доля штаммов, устойчивых к хинолонам и связанных с групповой заболеваемостью (68,0%; 95% ДИ 60,2–74,8) и пищевыми продуктами (73,6%; 95% ДИ 67,7–78,8), была выше по сравнению с другими источниками.

Сравнительная оценка фенотипической резистентности к классам АМП и серотипового разнообразия сальмонелл

Анализ устойчивости к классам АМП штаммов, относящихся к наиболее распространённым се-

ротипам сальмонелл, выявил превалирование резистентных штаммов среди серотипов *S. Typhimurium* и *S. Bovismorbificans*. В частности, доля штаммов, резистентных к пенициллинам, составила 57,1 и 93,9%, а к β-лактамам комбинированным препаратам — 57,1 и 87,9% соответственно. При этом доля устойчивых штаммов к антагонистам фолатного пути и к тетрациклинам у *S. Bovismorbificans* была на высоком уровне (90,9%; 95% ДИ 76,4–96,9) и значительно превышала аналогичные показатели по сравнению с *S. Typhimurium* (9,5%; 95% ДИ 3,8–22,1 и 47,6%; 95% ДИ 33,4–62,3 соответственно; **рис. 4**).

Штаммы *S. Infantis* отличались от остальных серотипов высокой устойчивостью к хинолонам (92,4%; 95% ДИ 86,2–96,0) и фениколам (24,4%; 95% ДИ 17,5–32,8), а также проявляли повышен-

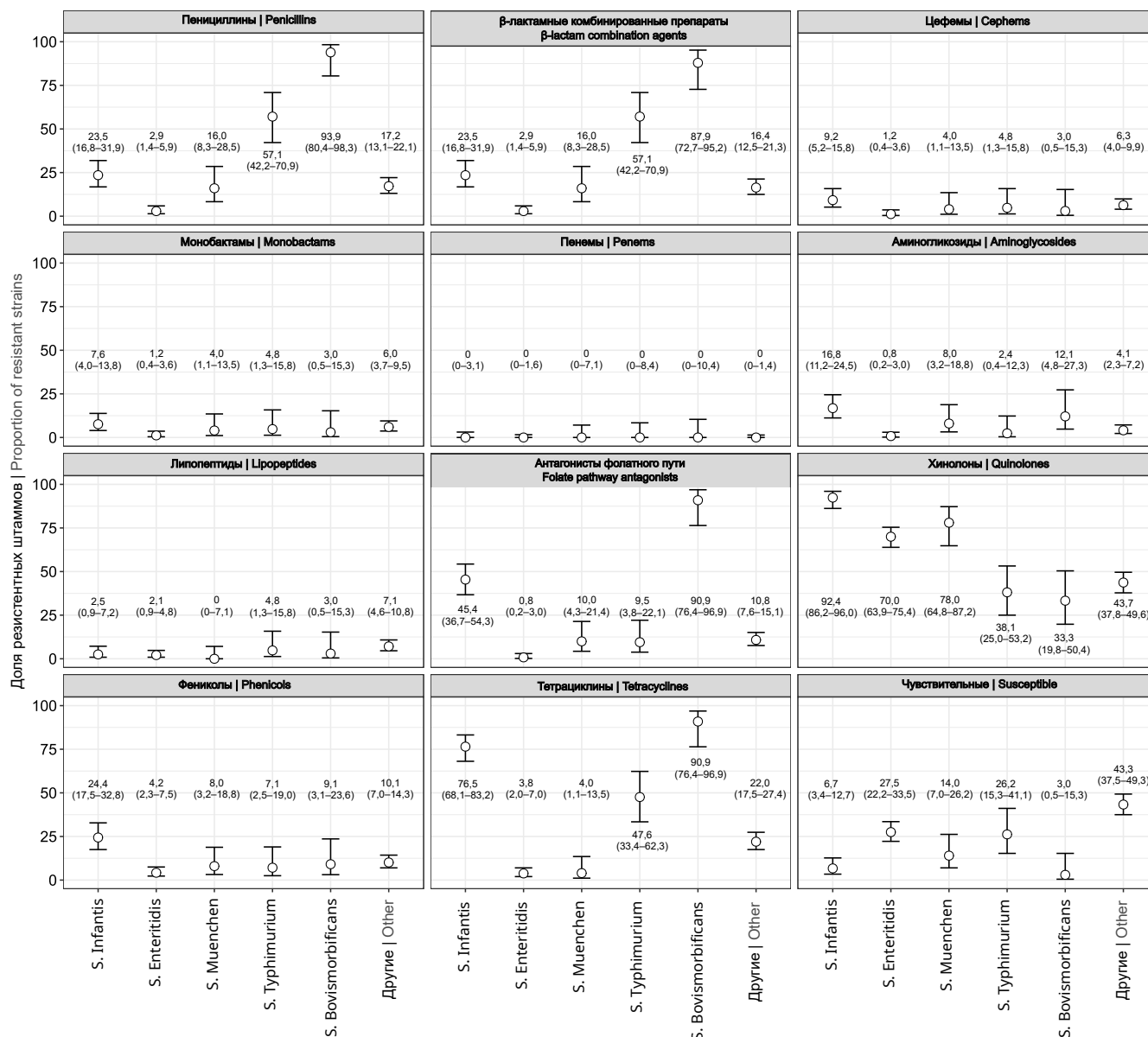


Рис. 4. Доля резистентных штаммов наиболее распространённых серотипов *Salmonella* (с указанием 95% ДИ) к классам АМП.

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

ную устойчивость к антагонистам фолатного пути (45,4%; 95% ДИ 36,7–54,3) и тетрациклином (76,5%; 95% ДИ 68,1–83,2).

Нужно отметить, что значительная часть штаммов всех серотипов проявляла устойчивость по отношению к хинолонам и разделились на 3 группы по степени устойчивости к данному классу АМП. К первой группе с самой высокой долей резистентных штаммов относился *S. Infantis*. Во вторую группу вошли *S. Enteritidis* (70,0%; 95% ДИ 63,9–75,4) и *S. Muenchen* (78,0%; 95% ДИ 64,8–87,2), среди которых доля устойчивых штаммов была значительно выше, чем для третьей группы, в которую входили *S. Typhimurium* (38,1%; 95% ДИ 25,0–53,2), *S. Bovismorbificans* (33,3%; 95% ДИ 19,8–50,4) и другие серотипы (43,7%; 95% ДИ 37,8–49,6).

Устойчивость штаммов всех проанализированных серотипов к цефемам, монобактамам и липопептидам не превышала 10%. Доля резистентных штаммов к аминогликозидам также держалась на низком уровне, не намного превышая 10% только для *S. Infantis* (16,8%; 95% ДИ 11,2–24,5) и *S. Bovismorbificans* (12,1%; 95% ДИ 4,8–27,3).

Сравнение разнообразия профилей резистентности штаммов *S. Enteritidis*, выделенных из очагов групповой заболеваемости и из клинических образцов спорадических случаев выявления сальмонелл

Количество профилей резистентности для штаммов *S. Enteritidis*, выделенных из очагов групповой заболеваемости ($n = 7$), было незначительно

Таблица 2. Число штаммов сальмонелл определенного профиля резистентности к АМП для сравниваемых групп *S. Enteritidis*, выделенных при групповой заболеваемости и спорадической заболеваемости**Table 2.** Number of *Salmonella* strains of a certain profile of resistance to antibiotics for the compared groups of *S. Enteritidis* isolated from outbreak cases and sporadic cases of salmonellosis

Профиль резистентности Resistance profile	Количество штаммов Number of strains
Групповая заболеваемость Outbreak cases	
Чувствительный Susceptible	35
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	90
Ампициллин, ампициллин/сульбактам, ципрофлоксацин, хлорамфеникол Ampicillin, ampicillin/sulbactam, ciprofloxacin, chloramphenicol	1
Ципрофлоксацин, хлорамфеникол, тетрациклин Ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline	5
Хлорамфеникол, тетрациклин Chloramphenicol, tetracycline	2
Колистин, ципрофлоксацин Colistin, ciprofloxacin	4
Тобрамицин, ципрофлоксацин Tobramycin, ciprofloxacin	1
Всего Total	138
Спорадическая заболеваемость Sporadic cases	
Чувствительный Susceptible	20
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	26
Ампициллин, ампициллин/сульбактам, пиперациллин, цефотаксим, цефтазидим, цефепим, азтреонам, ципрофлоксацин Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam, ciprofloxacin	2
Ампициллин, ампициллин/сульбактам, пиперациллин, цефотаксим, цефтазидим, цефепим, азтреонам Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam	1
Ампициллин, ампициллин/сульбактам, пиперациллин, триметоприм/сульфаметоксазол, ципрофлоксацин, тетрациклин Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, tetracycline	1
Ампициллин, ампициллин/сульбактам, пиперациллин, триметоприм/сульфаметоксазол Ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole	1
Ципрофлоксацин, хлорамфеникол Ciprofloxacin, chloramphenicol	2
Хлорамфеникол, тетрациклин Chloramphenicol, tetracycline	1
Тобрамицин, ципрофлоксацин Tobramycin, ciprofloxacin	1
Всего Total	55

меньше, чем при спорадической заболеваемости ($n = 9$; рис. 5). При этом все штаммы *S. Enteritidis* характеризовались высокой устойчивостью к хинолонам (70,0%; 95% ДИ 63,9–75,4) и резистентностью к другим классам АМП на уровне менее 5% (рис. 4). Только 27,5% (95% ДИ 22,2–33,5) были чувствительны ко всем исследованным антибиотикам. Сравнение индексов разнообразия Шеннона между группами штаммов *S. Enteritidis*, выделенных из очагов групповой заболеваемости ($H = 0,98$; 95% ДИ 0,81–1,15) и при спорадической заболеваемости ($H = 1,33$; 95% ДИ 1,03–1,62), показал достоверную разницу ($p < 0,05$) и преобладание в разнообразии профилей резистентности в случае спорадической заболеваемости (табл. 2).

Обсуждение

Мониторинг фенотипической антибиотикорезистентности является важным инструментом эпидемиологического надзора в борьбе с ростом рези-

стентности бактерий к АМП во всём мире, который направлен на получение информации о динамике изменений фенотипических особенностей социально значимых патогенов и разработку комплексных мер по решению этой проблемы. В представленных исследованиях, основываясь на обширной коллекции штаммов, мы предприняли попытку охарактеризовать резистентность нетифоидных сальмонелл, циркулирующих на территории России в последние годы.

Необходимо обратить внимание на то, что для создания выборки с целью оценки антибиотикорезистентности мы используем только выборку неповторяющихся штаммов сальмонелл, что, в отличие от тотального исследования всех штаммов, позволяет избежать неверного представления о частоте выявления того или иного профиля резистентности и получить объективные данные. Аналогичные методические подходы были использованы ранее в других работах [17, 18].

Оценка серотипового пейзажа сальмонелл и фенотипической резистентности к классам АМП показала, что доминирующее положение по частоте изоляции занимают серотипы *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Muenchen*, *S. Typhimurium*, *S. Bovismorbificans*, на которые приходилось 64,4% исследованных штаммов. Среди спорадической заболеваемости преобладали штаммы *S. Enteritidis*, а среди пищевых продуктов и окружающей среды — *S. Infantis*. При этом *S. Typhimurium* занимала 3-е место по частоте обнаружения в различных источниках.

Сопоставление уровней резистентности к основным классам АМП всей выборки штаммов в нашей работе с результатами предыдущих исследований показало сходную картину. По данным С.А. Егоровой и соавт., в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в 2014–2018 гг. процент устойчивых штаммов нетифоидных сальмонелл в среднем составил 78,6%, а штаммов, резистентных к хинолонам, — 63,3% [10], что коррелирует с результатами наших исследований (72,2 и 61,3% соответственно). Вместе с тем доля устойчивых штаммов к цефемам была почти в 2 раза ниже: 1,6% против 4,7%. Интересно, что доля выявленных штаммов с МЛУ-фенотипом была также в 2 раза ниже — 13,0% против 25,7% в нашей работе, что может быть связано с различиями в выборке штаммов относительно источников выделения. В то же время частота выявления штаммов сальмонелл с фенотипом МЛУ в Евросоюзе (28,6%) близка к нашим усреднённым данным по всей выборке штаммов [19]. Согласно отчёту Национальной системы мониторинга устойчивости кишечных бактерий к противомикробным препаратам (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria, NARMS)⁸ доля клинических штаммов с МЛУ-фенотипом среди нетифоидных сальмонелл в США за 2018 г. составила 9,3%, что в 2 раза выше по сравнению с долей штаммов с МЛУ, которые в нашем исследовании относились к групповой заболеваемости (4,6%), но почти в 3 раза ниже при сравнении со штаммами, обнаруженными при спорадической заболеваемости (26,7%). Доля клинических резистентных к отдельным классам АМП, например к хинолонам и цефемам, штаммов, выявленных в США, составил 8,5 и 3,5% соответственно, в нашем исследовании эти показатели соответствовали 68,0 и 0,0% для штаммов при групповой заболеваемости, и 51,1 и 7,0% для спорадических случаев заболеваний. Значительное расхождение в устойчивости к хинолонам объясняется в том числе разницей в критериях интерпретации CLSI и EUCAST.

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

Сравнительный анализ штаммов сальмонелл из разных источников позволил определить ряд закономерностей. Уровни резистентности ко многим классам АМП (пенициллинам, β-лактамам комбинированным препаратам, антагонистам фолатного пути и тетрациклинам) были выше у штаммов, не связанных с очагами групповой заболеваемости. Это наблюдение согласуется с ранними исследованиями, в которых показано, что приобретение резистентности, в частности, в результате горизонтального переноса генов, может снижать приспособленность и конкурентоспособность микроорганизма (бактериальный фитнес), оказывая пагубное действие на жизненно важные физиологические процессы бактерии [20, 21]. Исходя из полученных нами данных, это может проявляться в снижении вирулентных свойств сальмонелл и, как следствие, снижении эпидемического потенциала.

В пищевых продуктах был обнаружен наибольший процент штаммов, резистентных к тетрациклинам, а штаммы из окружающей среды характеризовались наибольшей частотой резистентности к липопептидам. Единственный класс АМП, к которому резистентность проявлялась на высоком уровне для разных источников, являлись хинолоны. Высокую частоту встречаемости резистентных штаммов сальмонелл к хинолонам среди различных источников можно объяснить широким использованием этой группы препаратов в животноводстве. Химическая стабильность этой группы антибиотиков и их способность к накоплению в различных объектах окружающей среды в низких концентрациях приводит к возникновению и отбору антибиотикорезистентных форм бактерий наиболее эффективно [22, 23]. Более того, хромосомные мутации, ассоциированные с резистентностью к хинолонам промежуточного уровня у *S. Enteritidis*, не влияют на уровень приспособленности микроорганизма [24].

В нашем исследовании процентное соотношение чувствительных и устойчивых штаммов из спорадической заболеваемости и окружающей среды (а именно в образцах из водоёмов и сточных вод) было примерно одинаковым, однако эти источники выделения значительно отличались по пейзажу доминирующих серотипов. Согласно ранее опубликованным данным [25, 26], несмотря на лидирующую позицию *S. Enteritidis* среди клинических изолятов, данный серотип редко встречался в образцах из сточных вод, в то время как *S. Infantis* являлся доминирующим серотипом по частоте изоляции. Полученные данные могут свидетельствовать о слабой выживаемости штаммов *S. Enteritidis* в окружающей среде по сравнению с другими серотипами. Если рассматривать соотношение резистентных штаммов к классам АМП для этих источников выделения, можно заметить, что устойчивость к хи-

нолонам, пенициллинам, β -лактамам комбинированным препаратам и тетрациклинам держалась на примерно одинаковом уровне. Однако штаммы, выделенные из окружающей среды, обладали большей устойчивостью к липопептидам и антагонистам фолатного пути.

Обращает на себя внимание, что самый высокий процент резистентных штаммов сальмонелл, включая МЛЮ, ассоциирован с пищевыми продуктами. Значительный вклад в показатели устойчивости к АМП для этого источника внесли штаммы *S. Infantis* с доминирующей резистентностью к хинолонам (92,4%), тетрациклинам (76,5%), антагонистам фолатного пути (45,4%), фениколам (24,4%), пенициллинам (23,5%) и β -лактамам комбинированным препаратам (23,5%). Кроме того, у данного серотипа был самый высокий процент штаммов, устойчивых к цефалоспорином III поколения (9,2%), что может свидетельствовать о выработке β -лактамаз. Распространение клонов *S. Infantis* с МЛЮ-фенотипом регистрируется по всему миру [27–29]. По данным NARMS, в период с 2018 по 2019 г. количество МЛЮ-изолятов сальмонелл, выделенных из образцов продуктов из мяса курицы, увеличилось с 22 до 29%, в то время как процент МЛЮ-изолятов из розничного мяса курицы — с 20 до 32%⁹. Значительный вклад в увеличение спектра резистентности внесло увеличение числа обнаруживаемых изолятов *S. Infantis* с МЛЮ-фенотипом, что может являться следствием применения таких препаратов, как ампициллин, ко-тримоксазол, хлорамфеникол и тетрациклин, в медицине и ветеринарии [11, 30, 31]. Устойчивость штаммов сальмонелл, выделенных из пищевых продуктов, к пенициллинам и тетрациклинам в нашей работе (26,8 и 49,0% соответственно) коррелирует с данными Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) [32], в которых устойчивость штаммов сальмонелл, выделенных из тушек бройлеров и индеек, к ампициллину и тетрациклину достигала 18,8–19,1 и 48,1–50,3% соответственно.

Анализ полученных данных позволил выявить особенности резистентности клинических штаммов сальмонелл, которые обнаруживались при разных эпидемиологических ситуациях: групповой и спорадической заболеваемости людей. Так, очаги групповой заболеваемости характеризовались самым высоким процентом штаммов, устойчивых к 1-2 классам АМП (67,3%), и наименьшим процентом МЛЮ-штаммов (4,6%). Напротив, доля МЛЮ-штаммов, выделенных при спорадической заболеваемо-

сти, была в 5,8 раза выше, чем для очагов групповой заболеваемости, что объясняется значительным вкладом в суммарную резистентность штаммов *S. Typhimurium* и других серотипов. Как и штаммы из очагов групповой заболеваемости, так и спорадические штаммы были чаще устойчивы к хинолонам, что подтверждается доминирующей резистентностью к этому классу АМП серотипов *S. Enteritidis* (70,0%) и *S. Muenchen* (78,0%). На резистентность к пенициллинам (22,6%), β -лактамам комбинированным препаратам (21,9%) и тетрациклинам (21,9%) значительно повлияло присутствие штаммов *S. Typhimurium*, которые чаще были устойчивы именно к этим классам АМП. Похожие данные опубликованы в совместном отчёте EFSA и Европейского центра профилактики и контроля заболеваний в 2022 г. [32], в котором говорится, что высокий процент МЛЮ-штаммов сальмонелл (25,4%), выделенных от людей в 2019–2020 гг., был обоснован значительным вкладом резистентных штаммов *S. Typhimurium* и *S. Kentucky*. Высокий уровень резистентности к ампициллину (29,8%), сульфонидами (30,1%) и тетрациклинам (31,2%) варьировался в зависимости от серотипа от низкого для *S. Enteritidis* до чрезвычайно высокого для *S. Typhimurium* и *S. Kentucky*.

На протяжении многолетнего мониторинга *S. Enteritidis* остаётся главным серотипом, вызывающим групповую заболеваемость сальмонеллёзами [33]. Наши данные демонстрируют, что как среди очагов групповой заболеваемости, так и в клинических образцах при спорадических случаях выявления сальмонелл доминирующим серотипом являлся *S. Enteritidis*. Кроме того, этот серотип занимал вторую ранговую позицию (16,3%) при выделении из пищевых продуктов. Сравнение штаммов *S. Enteritidis* из очагов групповой заболеваемости и спорадической заболеваемости показало незначительное различие в количестве профилей резистентности и низкий уровень резистентности ко многим классам АМП, кроме хинолонов. Однако, несмотря на превосходящее количество штаммов из очагов (в 2,5 раза выше, чем спорадических), разнообразие профилей резистентности было достоверно ниже. Ещё одной особенностью *S. Enteritidis* является высокая частота встречаемости штаммов с устойчивостью к хинолонам, которая составляла 70,0%, что согласуется с данными исследований, проведённых в Санкт-Петербурге [10], где устойчивость штаммов *S. Enteritidis*, выделенных от людей, составила 71,0%. По данным системы надзора NARMS¹⁰, штаммы *S. Enteritidis* в 2019 г. были наиболее распространённым серотипом среди изолятов со сниженной чувствительностью к ципрофлоксаци-

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)

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

ну, на его долю приходилось 45% сальмонелл, выделенных от людей. Известно, что устойчивость к хинолонам у сальмонелл может быть обусловлена наличием горизонтально (плазмиды, транспозоны, интегроны) и вертикально (хромосомные мутации) наследуемых генетических признаков [34]. При этом показано, что вклад хромосомных мутаций в резистентность к хинолонам для *S. Enteritidis* значительно выше [35]. Процент штаммов сальмонелл, устойчивых к хинолонам за счёт однонуклеотидных замен в области генов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, достигал 97,54%, в то время как присутствие плазмидопосредованной резистентности было обнаружено только для 1,1% штаммов [36].

Второе место по числу штаммов, выделенных от человека, занимал серотип *S. Muenchen* (12,6%). Он также являлся этиологическим агентом 2 случаев групповой заболеваемости в течение четырехлетнего периода наблюдения. Увеличение заболеваемости этим серотипом регистрируется как в отдельно взятых регионах России [37, 38], так и в других странах [39]. По данным референс-центра, по мониторингу за сальмонеллёзами¹¹ за 2021 г. штамм *S. Muenchen* занимал 5-ю ранговую позицию по частоте изоляции от людей и пищевых продуктов и 6-ю — из внешней среды. Интересно отметить, что в нашей работе *S. Enteritidis* и *S. Muenchen* обладали наименьшим разнообразием профилей резистентности и не значительно отличались между собой.

Заключение

В представленном исследовании мы описали фенотипическую устойчивость сальмонелл и сравнили разнообразие профилей устойчивости самых распространённых серотипов на территории России, основываясь на выборке неповторяющихся штаммов нетифоидных *Salmonella*. Значительный вклад в популяцию резистентных сальмонелл вносят штаммы, не относящиеся к групповой заболеваемости. Почти половина (57,6%) исследованных штаммов были резистентны как минимум к одному АМП, среди которых наиболее часто выявлялась устойчивость к хинолонам, тетрациклинам, пенициллинам и антагонистам фолатного пути, которые длительное время применялись или в настоящее время используются в медицине и ветеринарии. Кроме того, нетифоидные *Salmonella*, выделенные из различных источников, обладали большим разнообразием профилей резистентности. Среди них наибольшее число штаммов, характеризующихся резистентностью, были обнаружены среди серотипов *S. Infantis*, *S. Typhimurium* и *S. Bovismorbificans*.

Постоянный мониторинг антибиотикорези-

стентности и отслеживание МЛУ-штаммов сальмонелл играет ключевую роль в решении задач по борьбе с антибиотикорезистентностью и представляет ценную информацию для эпидемиологического надзора с целью разработки стратегий профилактики.

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 сальмонеллёзов. *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., Сузаева 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

¹¹ Рожнова С.Ш., Подколзин А.Т., Кулешов К.В. и др. Информационный бюллетень референс-центра по мониторингу за сальмонеллёзами № 34. М.; 2022.

- 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/tpjhjx>
 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/ytldub>
 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/xtf1rn>
 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 phylogenetic 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., Fàbrega 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., Semeykina 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>

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>

Крутova 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

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

Научная статья

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

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 $6,51 \pm 0,19$ Ig. Количество жизнеспособных клеток бактерий в составе БП снижалось на 4 Ig 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 Ig. Эффективность воздействия хлораминовых 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 (хлораминовые 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>

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>

Введение

Способность микроорганизмов к биоплёнкообразованию практически на любых поверхностях является большой проблемой в медицинской практике и других областях человеческой жизнедеятельности [1–3]. Биологическая плёнка (БП) образуется в результате адгезии бактерий к поверхностям объектов окружающей среды, что особенно выражено в условиях высокой влажности [3]. БП состоит из непрерывного мультислойа бактериальных клеток, прикреплённых к поверхности и/или друг к другу, заключённых во внеклеточный полимерный матрикс, состоящий в основном из полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот [3, 4]. Матрикс обеспечивает структуру БП, стабильность и защиту микробных клеток внутри БП от обезвоживания и других неблагоприятных для них воздействий окружающей среды [4–7]. Микроорганизмы в БП составляют около 10% от сухой массы, матрикс — до 90% [8].

Исследования [9–12] показали, что бактерии в составе БП более устойчивы к воздействию дезинфицирующих веществ (ДВ), чем их планктонные формы. Это во многом обусловлено затруднением

проникновения химических соединений (ДВ) через внеклеточный матрикс, а также снижением метаболизма и скорости деления бактерий в БП [5, 7]. В результате режимы дезинфекции объектов внутрибольничной среды, разработанные с использованием планктонных клеток, неэффективны в отношении микроорганизмов в составе БП, а официальные методы оценки эффективности ДВ в отношении микроорганизмов в составе БП отсутствуют.

Вместе с тем в многочисленных исследованиях продемонстрировано присутствие сухих микробных БП на многих поверхностях в медицинских учреждениях [13–15]. Патогенные микроорганизмы, включённые в БП, на сухих поверхностях могут выживать в течение длительного времени и периодически высвобождаться в виде свободноживущих планктонных клеток в окружающую среду. БП, будучи резервуаром патогенных микроорганизмов, функционируют как источник распространения патогенных бактерий во внутрибольничной среде [16]. Исследованиями [17–19] подтверждена важная роль микробных БП, обнаруживаемых на эпидемиологически значимых объектах в медицинских

учреждениях, в распространении и передаче госпитальных штаммов микроорганизмов и возникновении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

В настоящее время отсутствуют комплексные системные исследования по изучению воздействия биоцидов на микроорганизмы в составе БП и способности существующих рецептур моющих и дезинфицирующих средств разрушать БП.

В связи с этим была поставлена цель — определить антимикробную активность и разрушающее действие основных ДВ дезинфицирующих средств — хлорактивных и кислородоактивных соединений, катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ), спиртов и альдегидов — в отношении тест-микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P в составе БП.

Материалы и методы

Для дезинфекции поверхностей в помещениях медицинских учреждений рекомендуется использовать ДВ на основе катионных ПАВ, спирта, перекись водорода и средства на основе хлора. Для исследования отобраны химические соединения — наиболее типичные представители основных ДВ, используемых в качестве активного вещества в рецептурах дезинфицирующих средств:

- из группы катионных ПАВ — алкилдиметилбензиламмоний хлорид (АДБАХ) в концентрациях 0,1–1,0%, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ) — 0,02–0,05%, третичный алкиламин (ТА) — 0,1–1,0%;
- из группы кислородоактивных — перекись водорода (ПВ) в концентрациях рабочего раствора 3–6%;
- из группы хлорактивных — средство дезинфицирующее Хлорамин (ХА) в концентрациях рабочего раствора 0,5–1,0% по препарату; натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты (Na-ДХЦК) 0,03–0,10% по активному хлору (АХ), гипохлорит натрия (ГХ) — 0,5–1,0% по АХ;
- из группы спиртов — этиловый спирт (ЭС) — 40–70%;
- из группы альдегидов — глутаровый альдегид (ГА) — 0,25–1,00%.

Средства на основе хлора и перекиси водорода при дезинфекции поверхностей наиболее часто используются с добавлением 0,5% моющего средства в целях придания дополнительно моющих свойств. В связи с этим изучена эффективность химических соединений Na-ДХЦК, ГХ и ПВ с добавлением 0,5% сульфанола, который является анионным ПАВ.

В качестве тест-микроорганизмов использованы референс-штаммы из коллекции американских типовых культур (АТСС) — *P. aeruginosa*

sa ATCC 15442 и *S. aureus* ATCC 6538-P. Данные референс-штаммы используются для оценки бактерицидной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий в соответствии с Р 4.2.3676-20 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности» [20].

Культивирование БП бактерий осуществляли статическим методом в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах для микротитрования согласно G.A. O'Toole и соавт. [21]. Суточные культуры штаммов бактерий стандартизировали до 2,0 по McFarland и разводили 1 : 100 в триптон-соевом бульоне. В лунки 96-луночного плоскодонного планшета вносили по 100 мкл бульонных культур бактерий и закрытые планшеты выдерживали статически в термостате при 37°C в течение 24 ч для формирования БП. После этого лунки планшетов трехкратно промывали фосфатно-буферной средой с целью удаления планктонных клеток. Затем в опытную часть лунок вносили 100 мкл ДВ в различных концентрациях, в контрольные лунки — физиологический раствор (0,9% NaCl), далее выдерживали 30 мин, после чего добавляли 100 мкл нейтрализатора, содержащего Твин 80 (3%), сапонин (0,3–3,0%), гистидин (0,1%), цистеин (0,1%), тиосульфат натрия (0,1%).

Эффективность воздействия на сформированные БП ДВ оценивали путём определения относительной оптической плотности красителя — кристаллического фиолетового, который связывался с матриксом БП. Для этого в лунки вносили 200 мкл 0,1% водного раствора кристаллического фиолетового и выдерживали 30 мин. Биомассу БП оценивали по уровню экстракции этанолом красителя, который измеряли на микропланшетном ридере «TECAN DESKTOP-4A7U9AL/Infinite M Plex» при длине волны 580 нм в единицах оптической плотности (OD).

Для оценки жизнеспособности клеток в БП в лунки вносили 100 мкл фосфатно-буферной среды и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин при 37 кГц, поместив планшеты в ультразвуковую ванну «Elma Ultrasonic 30S» («Elma»). Жизнеспособность клеток оценивали по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) после посева на плотную питательную среду (триптон-соевый агар) и подсчетом КОЕ/мл после инкубации при 37°C 24 ч.

Для достоверного обобщения результатов использовали 6 лунок на 1 опытный образец и рассчитывали среднюю величину оптической плотности опытного образца и логарифмическое число КОЕ. Далее сравнивали усреднённые показатели оптической плотности элюата из БП и КОЕ/мл, обработанных ДВ, с аналогичными в контроле. Сравнения проводили по t-критерию Стьюдента [22]. Данные

Результаты

обрабатывали с использованием пакета статистических программ «MS Excel для Windows». Значение $p < 0,05$ принимали статистически значимым.

ДВ считали эффективным в отношении тест-микроорганизмов в БП, если количество жизнеспособных клеток в составе БП после воздействия ДВ снизилось на 4 порядка и более. Если показатель оптической плотности после экспозиции снизился более чем на 70% по сравнению с контролем, считали, что ДВ обладает высокой эффективностью, снижение на 30–70% — средней, менее 30% — низкой.

Исследуемые культуры микроорганизмов *P. aeruginosa* ATCC 15442 и *S. aureus* ATCC 6538-P через 24 ч образовывали БП плотностью $OD_{580} = 1,50 \pm 0,19$. Среднее количество жизнеспособных клеток в БП составило $6,2 \pm 0,7$ lg.

Воздействие на сформированные БП 0,1% и 1,0% растворов АДБАХ приводило к снижению плотности БП по сравнению с контролем (первичной БП) на $48,6 \pm 9,5$ и $51,2 \pm 8,1\%$ (рис. 1) и снижению количества жизнеспособных клеток в БП на 2 и 3 lg (рис. 2) соответственно.

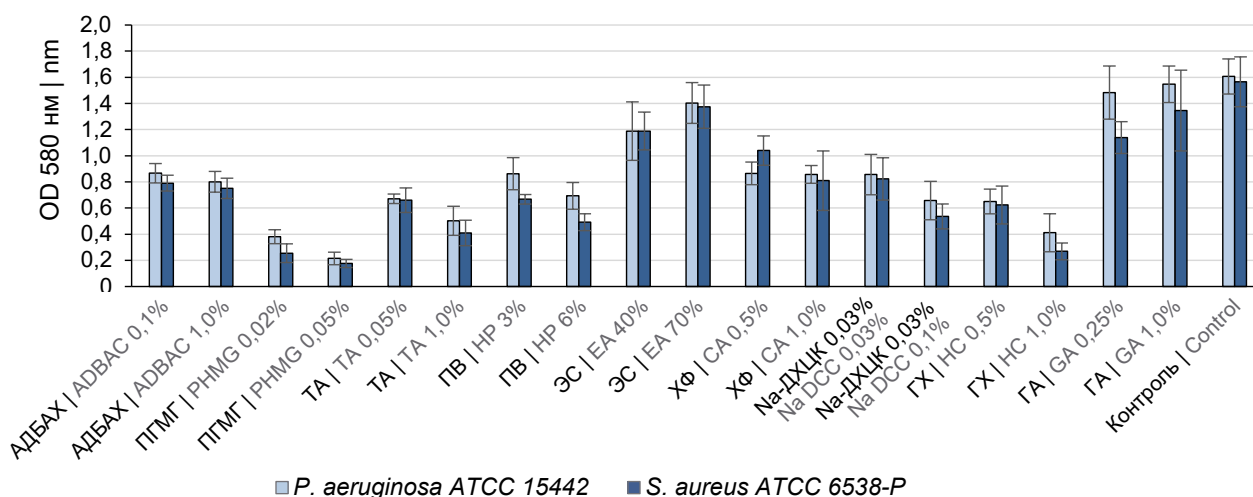


Рис. 1. Сравнительная оценка воздействия ДВ на плотность сформированных БП *P. aeruginosa* ATCC 15442 и *S. aureus* ATCC 6538-P.

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.

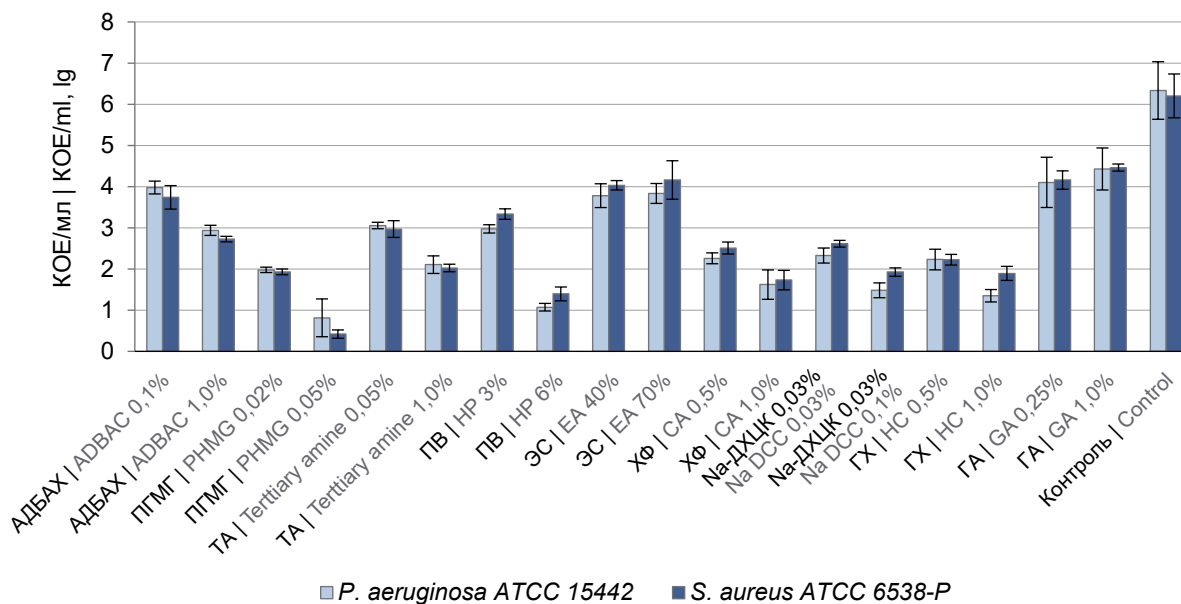


Рис. 2. Сравнительная оценка воздействия ДВ на выживаемость клеток *P. aeruginosa* ATCC 15442 и *S. aureus* ATCC 6538-P в БП.

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.

При действии растворов ТА на БП наблюдалась прямая зависимость между повышением концентрации ДВ и разрушением матрикса БП. После воздействия на сформированные БП 0,1% и 1,0% растворов ТА плотность БП снижалась на $58,2 \pm 5,5$ и $72,5 \pm 8,2\%$, а количество жизнеспособных клеток уменьшалось на 3 и 4 lg соответственно.

При воздействии на БП *P. aeruginosa* ATCC 15442 и *S. aureus* ATCC 6538-P 0,02 и 0,05% растворами ПГМГ наблюдали значительное снижение её плотности — на $78,1 \pm 9,3$ и $87,5 \pm 5,9\%$ и снижение количества жизнеспособных клеток на 5 lg и более.

При воздействии растворами ГА в концентрациях 0,25 и 1,0% наблюдалось слабое снижение плотности БП — на $24,66 \pm 9,6$ и $10,75 \pm 4,5\%$ и незначительное уменьшение количества микроорганизмов.

ЭС в концентрациях 40 и 70% также оказывал слабое разрушающее действие на БП. С увеличением концентрации ЭС наблюдалось снижение эффективности воздействия. Под влиянием 40% ЭС плотность БП снизилась на 20–25%, а 70% — на 10–12,5% (рис. 1).

Рабочие растворы ПВ в концентрации 3% снижали плотность БП *P. aeruginosa* ATCC 15442 и *S. aureus* ATCC 6538-P на $46,55 \pm 9,45$ и $54,45 \pm 7,5\%$, а количество жизнеспособных клеток — на 2,8 и 3 lg соответственно (рис. 1, 2). При увеличении концентрации ПВ до 6% эффективность воздействия возрастала и наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток — на 4,0–4,5 lg.

При воздействии хлорактивных соединений на БП наблюдалась зависимость эффективности от концентрации ДВ. Более эффективными были 1,0% раствор ХА (по препарату), 0,1% раствор Na-ДХЦК (по АХ) и 1,0% раствор ГХ (по АХ) в сравнении с более низкими концентрациями этих ДВ (рис. 1, 2).

При добавлении в рабочие растворы 3% ПВ, 0,03% Na-ДХЦК (по АХ) и 0,5% ГХ (по АХ) моющего компонента сульфанола в концентрации 0,5% эффективность антимикробного воздействия на микроорганизмы в составе БП увеличилась на 40–52% (рис. 3).

Обсуждение

Результаты действия дезинфицирующих растворов на БП не однозначны. Действие ДВ обычно ограничивается взаимодействием только с поверхностным слоем БП, поскольку матрикс не позволяет молекулам ДВ свободно диффундировать в глубокие слои. Также известен тот факт, что некоторые из них способны вызвать обратный эффект, проявляющийся в стимуляции роста БП. Это связано с их разрушающим действием только на поверхностные структуры, что облегчает поступление питательных веществ внутрь БП [9, 10].

Эффективность коммерческих дезинфицирующих средств изучена лишь в отношении планктонных форм микроорганизмов, данные об их биоцидной активности в отношении микроорганизмов, растущих в составе БП, отсутствуют. Несмотря на большое количество работ по стратегии борьбы с БП, до сих пор не найдены ДВ, которые могли бы специфически подавлять образование БП и убивать бактерии внутри БП, вызывая при этом их деградацию, разрушая матрикс. Системное исследование основных ДВ в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов в БП проведено впервые. В результате выполненных исследований показано, что ПВ в концентрации 6%, раствор Na-ДХЦК — 0,1% (по АХ), ГХ — 1,0% (по АХ), ХА — 1,0% (по препарату), ПГМГ — 0,05%, ТА — 1,0% снижают количество микроорганизмов в БП на 4 lg и более, а плотность БП — на 70% и более. Необходимость применения биоцидов из группы окислителей в более высоких эффективных концентрациях, вероятнее всего, связана с частичной их инактивацией биополимерами в поверхностных слоях БП. Матрикс БП ограничивает диффузию через поверхность БП вглубь и нейтрализует часть ДВ, обеспечивая устойчивость микробной БП к действию этих соединений. Поскольку для придания моющих свойств хлорактивным соединениям в условиях практического использования к ним добавляют моющие вещества, изучено действие растворов этих соединений при добавлении 0,5% сульфанола. Установлено повышение эффективности воздействия хлорактивных соединений и ПВ, что, возможно, связано с повышением проницаемости матрикса БП под воздействием анионного ПАВ — сульфанола, способствовавшего повышению диффузии ДВ в БП из-за снижения поверхностного натяжения раствора и, следовательно, улучшения смачивания поверхности БП.

Из группы катионных ПАВ наименее активным в отношении бактерий в БП был АДБАХ. Это связано с тем, что отрицательно заряженные полисахариды БП способны связывать положительно заряженные молекулы АДБАХ и тем самым защищать БП от деструкции [23]. Вместе с тем имеются данные литературы о возможности применения четвертичных аммониевых соединений для борьбы с микробными БП при усилении их действия синергистами или ферментами в композиционных средствах [24].

ТА проявлял достаточное действие в концентрации 1%. Особенностью ТА является сочетание антимикробных и моющих свойств. За счёт наличия свободных аминогрупп и атома третичного азота формируется щелочная среда, что способствует повышению антимикробной активности [24].

ПГМГ продемонстрировал бактерицидные преимущества по сравнению с АДБАХ и ТА. Вы-

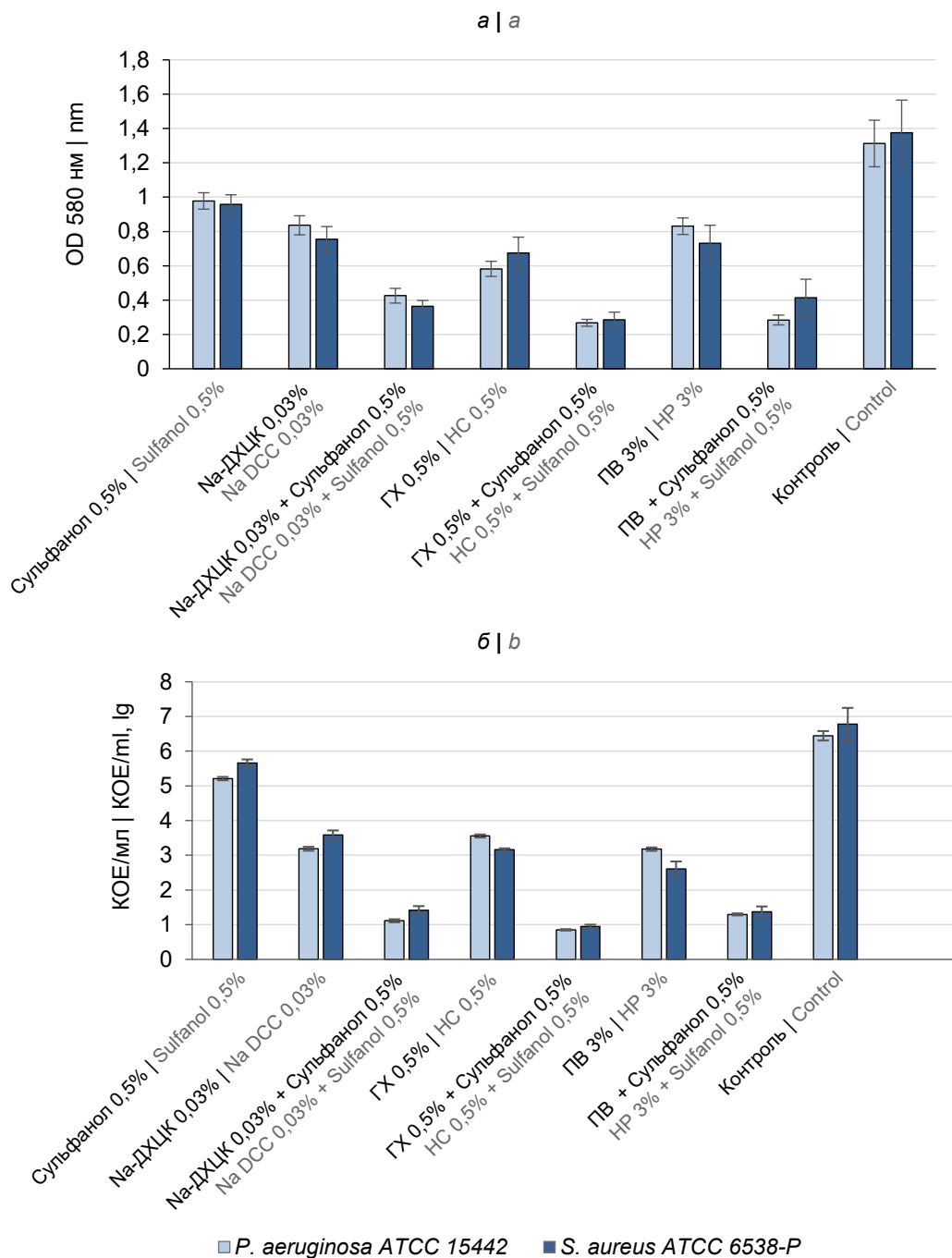


Рис. 3. Сравнительная оценка ДВ с добавлением мощного средства на плотность БП (а) и выживаемость (б) *P. aeruginosa* ATCC 15442 и *S. aureus* ATCC 6538-P.

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.

сокие показатели снижения плотности БП и выраженного антимикробного действия свидетельствует о существенном нарушении целостности структуры БП в результате разрушения полисахаридного матрикса и воздействии на бактерии. Механизм действия этого эффекта пока не раскрыт и требует более глубокого изучения.

Растворы ГА (0,25–1,00%) и ЭС (40–70%) на деструкцию БП и гибель микроорганизмов в БП

вливали очень слабо. В исследованиях [25] было обнаружено, что ГА реагирует с аминогруппами БП, поперечно сшивая длинные молекулы биополимеров, чем вызывает лишь набухание или коагуляцию поверхностного слоя БП, делая невозможным дальнейшую диффузию ГА вглубь микробной БП. Низкая эффективность ЭС связана с наличием фиксирующего действия и плохим проникновением молекул спирта в богатые белком материалы [26].

С повышением концентрации спирта плотность БП повышалась.

Заключение

Для борьбы с микробными БП перспективны дезинфицирующие вещества из группы окислителей (хлорактивные и кислородсодержащие), ТА и ПГМГ; применение четвертичных аммониевых соединений как индивидуального соединения не эффективно; альдегиды и спирты для разрушения БП и уничтожения в ней микроорганизмов не пригодны. Применённая для оценки эффективности биоцидов методика может быть рекомендована для исследования и оценки дезинфицирующей активности средств для борьбы с микробными БП на этапе первичного отбора.

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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Руководство Р 4.2.3676-20. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. М.; 2021.
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>

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

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

Научная статья

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

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 РФФ 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/uwguuml>

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

Georgy M. Ignatyev¹, Alexey S. Oksanich¹, 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, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100(5):310–318.

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

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

Введение

Комары родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. являются переносчиками ряда возбудителей вирусных заболеваний: лихорадки денге, Зика, жёлтой лихорадки, Чикунгунья, Венесуэльского энцефаломиелита лошадей, Синдбис, относящихся к семействам *Flaviviridae* (род *Flavivirus*) и *Togaviridae* (род *Alphavirus*) [1–6]. Ареал обитания комаров родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. распространяется на Южную и Центральную Америку, включая Ника-

рагу [2, 3, 7–10]. Мониторинг за распространением комаров-переносчиков и оценка их инфицированности могут дать информацию о возможности появления новых заболеваний или увеличения случаев уже регистрируемых, а смена переносчика возбудителя может приводить к изменениям инфекционности вирусов для человека [5]. Выделение вирусов непосредственно от переносчиков, отловленных в естественных ареалах обитания, и изучение выделенных штаммов необходимы в процессе разработки средств

диагностики, профилактики и лечения заболеваний, вызываемых альфа- и флавивирусами.

Целью данной работы было 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

Комары были отловлены в 2021 г. в сухой сезон в лесной зоне Никарагуа в четырех разных локациях с координатами:

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

Среди отловленных комаров были представители родов *Aedes* spp. (*A. albopictus*, *A. aegypti*), *Culiseta* spp. и *Culex* spp. После определения видов комары были разделены на пулы по 5–8 особей одного вида, отловленных в одной локации. В общей сложности было создано 236 пулов. Каждый пул был гомогенизирован до получения суспензии в объеме 300 мкл среды Лейбовица L-15 («Gibco», «Thermo Fisher Scientific») pH 7,4 с использованием керамических шариков и гомогенизатора «SpeedMill Plus» («Analytik Jena»). Из гомогената каждого пула было отобрано по 140 мкл для выделения РНК, которую экстрагировали с использованием набора реагентов «QIAamp Viral RNA» («Qiagen»). При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ) использовали протоколы для каждого возбудителя. Те пулы, в которых были получены положитель-

ные результаты на какой-либо из тестируемых вирусов, были использованы для последующего выделения вируса на клетках.

Выделение вируса

Оставшийся объем суспензии комаров (200 мкл) фильтровали через фильтр PES 0,45 мкм. Полученным фильтратом проводили заражение монослоя клеток С6/36, выращенных в 24-луночных планшетах. Инфицирование проводили в объеме 100 мкл с использованием цельного препарата и разведения 1 : 10. Через 7 дней после инфицирования 100 мкл супернатанта использовали для следующего пассажа. Всего от первого заражения проведено 5 последовательных пассажей. После заражения клетки ежедневно осматривали на наличие признаков цитопатического действия.

Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование методом ОТ-ПЦР проводили по следующей методике. Из 140 мкл суспензии комаров с помощью комплекта реагентов «QIAamp Viral RNA» («Qiagen») выделяли РНК согласно инструкции производителя. Далее с использованием обратного праймера рNS1CHVrev2-3 для вируса Чикунгунья (ВЧ; область гена *NS1*); смеси обратных праймеров к вирусу денге panDVrev1 и panDVrev2 (область 3'-UTR), общих для всех 4 типов вируса (табл. 1); обратного праймера для вируса Зика рZVrev [9]; обратного праймера вируса желтой лихорадки рYFVrev (табл. 2) [11] и набора реагентов для ОТ («Синтол») на матрице вирусной РНК проводили реакцию ОТ и получали кДНК. На первом этапе смешивали 2 мкл обратных праймеров (10 пкмоль/мкл) с 6 мкл выделенной РНК и прогревали смесь при 95°C 5 мин.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для выявления РНК ВЧ и вируса денге в полевых образцах методом ОТ-ПЦР в реальном времени

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

Олигонуклеотид Oligonucleotide	Нуклеотидная последовательность, 5'–3' Nucleotide sequence, 5'–3'	Размер ПЦР-продукта PCR product size
ВЧ (область гена NS1) CHIKV (the NS1 gene region)		
pNS1CHVfor	GTGTGCTGTTCTCAGTAGGGTCAACG	218 п.н. bp
pNS1CHVrev	GTCTGCGTGGTGGTTACCGC	
zNS1CHVfor	FAM-GGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCC-BHQ1	
Вирус денге (область 3'-UTR) Dengue virus (the 3'-UTR region)		
panDVfor	GACTAGYGGTTAGAGGAGACCC	190 п.н. bp
panDVrev1	CGTTCGTGCGCTGGAATGATG	
panDVrev2	CGCTCTGTGCGCTGGATTGATG	
zDVfor	FAM-GCATATTGACGCTGGGARAGACCAGAG-BHQ1	

Примечание. Y — либо C, либо T; R — либо A, либо G.

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

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации РНК вирусов Зика и жёлтой лихорадки методом ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией

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

Олигонуклеотид Oligonucleotide	Нуклеотидная последовательность, 5'–3' Nucleotide sequence, 5'–3'	Размер ПЦР-продукта PCR product size
Зика (область гена NS5) Zika (the NS5 gene region)		
pZVfor	CCGCGCCATCTGGTATATGT	450 п.н. bp
pZVrev	CTCCACTGACTGCCATTTCGT	
Жёлтая лихорадка (область гена E) Yellow fever (the E gene region)		
pYFVfor	TACCCTGGAGCAAGACAAGT	465 п.н. bp
pYFVrev	GCTTTTCATACCCAATGAA	

После чего охлаждали пробирки при комнатной температуре 2 мин и добавляли 22 мкл смеси для ОТ (9 мкл деионизированной воды, 12 мкл 2,5-кратного буфера для ОТ («Синтол»), 1 мкл MMLV-ревертазы («Синтол»)) и инкубировали при 42°C, 30 мин. Для инактивации ревертазы смесь прогревали в течение 5 мин при 95°C.

Для вирусов Зика и жёлтой лихорадки проводили ПЦР с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с использованием неоригинальных праймеров других авторов [9, 11], которые представлены в табл. 2. Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C — 1 мин 30 с; 30 циклов: 95°C — 20 с, 55°C — 15 с, 72°C — 30 с; 72°C — 10 мин.

ПЦР в реальном времени проводили на ВЧ и вирус денге с использованием оригинальных праймеров и зондов. Амплификацию проводили на приборе «DTprime» («ДНК-Технология») по следующей программе: 95°C — 1 мин 30 с; 40 циклов: 95°C — 15 с, 55°C — 40 с.

Для получения фрагментов генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* ВЧ и их секвенирования использовали олигонуклеотиды собственной разработки и методику, описанные ранее [12].

Все ПЦР-продукты перед секвенированием очищали из геля с использованием набора реагентов «Cleanup Standard» (#BC022, «Евроген») и клонировали в векторе «pGEM-T Easy» («Promega») в соответствии с инструкцией производителя. Затем отбирали клоны, выделяли из них плазмиды и секвенировали по Сэнгеру с использованием стандартных праймеров для секвенирования T7 и SP6. Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы «MEGA11»¹.

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ проводили с использованием метода молекулярного датирования с по-

мощью пакета программ «BEAST v. 1.10.4» и приложения «Beauty v. 1.10.4»². При построении деревьев применяли алгоритм нуклеотидных замен НКУ³ со строгими молекулярными часами. Анализ проводили с построением 10 млн деревьев и отбирали каждое 1000-е дерево с использованием программного обеспечения «MEGA11». Множественное выравнивание проводили с использованием генетических последовательностей фрагментов геномов ВЧ (*E2*, *6K*, *E1*), изолированных в разных регионах мира из комаров (30 последовательностей). Позиция в геноме фрагмента, по которому проводили филогенетический анализ, составила 8574–11 303 нт (позиции указаны по прототипному штамму 1959 г., номер GenBank KX262990). Также в филогенетическое дерево было добавлено 8 нуклеотидных последовательностей ВЧ, изолированных от человека, 3 из которых были получены от больных в Никарагуа в 2014 и 2015 гг. и 4 представляли собой референсные последовательности вируса.

Инфицированность комаров определяли, как описано ранее [10, 13].

Результаты и обсуждение

В результате отлова в четырех локациях были собраны комары трех родов *Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp. Как следует из представленных в табл. 3 данных, в наибольшем количестве были представлены комары рода *Aedes* spp. — 954 особи: 604 (67%) особи *A. aegypti*, 314 (33%) особи *A. albopictus*. При исследовании 105 пулов комаров *A. aegypti* в 7 пулах была определена РНК вируса денге, в 3 пулах — РНК ВЧ. РНК вирусов Зика и жёлтой лихорадки не обнаружена. Не было отмечено одновременной детекции РНК ВЧ и вируса денге. При исследовании 54 пулов комаров *A. albopictus* в 1 пуле была выяв-

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

Таблица 3. Род и количество отловленных комаров**Table 3.** Genus and number of captured mosquitoes

Вид комаров Mosquito species	Количество особей Number of mosquitoes	Количество пулов Number of pools	Результаты ПЦР (положительные/отрицательные) PCR results (positive/negative)			
			вирус Денге dengue virus	ВЧ CHIKV	вирус жёлтой лихорадки yellow fever virus	вирус Зика 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

лена РНК вируса денге, в 1 пуле — РНК ВЧ. РНК вирусов Зика и жёлтой лихорадки также не была обнаружена. Одновременной детекции РНК ВЧ и вируса денге не отмечено. В 46 пулах комаров рода *Culex* spp. и в 31 пуле комаров рода *Culiseta* spp. РНК детектируемых вирусов не выявлено.

Для ВЧ комары положительного пула *A. albopictus* были отловлены в локации 1, а положительных пулов комаров *A. aegypti* — в локации 4. РНК вируса денге была определена в пулах комаров *A. aegypti*, отловленных в локации 2, и *Aedes albopictus*, отловленных в локации 2.

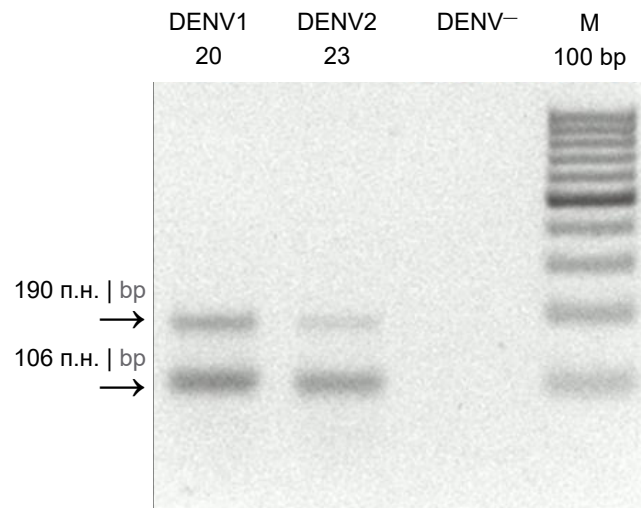
Минимальный уровень инфицирования комаров *A. aegypti* по вирусу денге составил 10,0, по ВЧ — 4,6. Минимальный уровень инфицирования комаров *A. albopictus* по вирусу денге и ВЧ составил 3,0. На основании полученных результатов можно предположить, что комары рода *Aedes* spp. инфицированы вирусом денге и ВЧ.

Показатель минимальной инфицированности комаров, безусловно, является важным показателем, но зависит от количества отловленных комаров (объём исследуемой выборки) и количества комаров в пуле, что влияет на чувствительность используемого метода. В ряде работ по исследованиям минимальной инфицированности комаров альфа- и флавивирусами этот показатель колебался от 0 до 12, что могло свидетельствовать только о потенциальной опасности заражения именно этим вирусом от этого комара [10, 13]. Возможность одновременного протекания лихорадки денге и Чикунгунья была показана ранее, а исследование серологических маркеров флави- и альфавирусов продемонстрировало наличие антител к вирусу денге и ВЧ [9, 14]. Для выделения вирусов использовали положительные по результатам ОТ-ПЦР пулы комаров — 8 пулов с вирусом денге и 4 пула с ВЧ.

Для выделения вирусов из полученных пулов комаров использовали клетки С6/36. Для каждого пула было проведено 5 последовательных пассажей. В клетках, заражённых образцами, содержащими ВЧ (по результатам ОТ-ПЦР), нарушение монослая клеток — развитие цитопатического дей-

ствия — регистрировалось на 2–3-м пассаже. При проведении 5-го пассажа 100% цитопатический эффект регистрировался на 72 ч. Для образцов, содержащих вирусы денге (по результатам ПЦР), цитопатический эффект не был столь выраженным. На каждом пассаже контроль за подлинностью изолятов и отсутствием перекрёстной контаминации проводился с использованием ОТ-ПЦР. По окончании выделения изолятов их секвенировали. В результате были получены изоляты, содержащие ВЧ, вирусы денге 1-го и 2-го типов. В отношении вирусов денге определяли только тип вируса из-за коротких фрагментов ПЦР-продуктов.

Как видно из электрофореграммы ампликонов (рис. 1), полученных с использованием универсальных праймеров ко всем 4 типам вируса денге, при

**Рис. 1.** Электрофорез ПЦР-продуктов в 2% агарозном геле.

DENV1 20 и DENV2 23 — ампликоны вирусов денге 1-го и 2-го типов, полученные в 20 и 23 пулах соответственно;

DENV⁻ — отрицательный контроль ПЦР на вирус денге;
M 100 bp — весовой ДНК-маркер.

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.

амплификации образуются 2 продукта длиной 190 и 106 п.н. Как показало секвенирование фрагментов, они оба являются специфическими [15].

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* ВЧ из комаров *A. albopictus* (1 пул, локация 1) показало, что это был тот же штамм, который был изолирован в 2018 г. в этой же локации [12]. По сравнению с аналогичными последовательностями генов из изолятов ВЧ, выделенных из комаров *A. aegypti* (3 пула, локация 4), в области гена белка 6K было обнаруже-

но 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 и в области *NS1* — 33 нуклеотидные и 19 аминокислотных замен (табл. 4). Три изолята, выделенные из комаров *A. aegypti*, не имели аминокислотных замен относительно друг друга. Выделенный штамм был депонирован в базе данных генетических последовательностей GenBank (NCBI) под номером OQ320495.

Таблица 4. Перечень нуклеотидных и аминокислотных замен в областях генов *6K*, *E1*, *E2* и *NS1* у изолятов ВЧ, выделенных из комаров *A. albopictus* и *A. aegypti*, отловленных в разных локациях Никарагуа

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

Замены <i>A. albopictus</i> > <i>A. aegypti</i> Substitutions <i>A. albopictus</i> > <i>A. aegypti</i>							
ген белка 6K 6K protein gene		ген белка E1 E1 protein gene		ген белка E2 E2 protein gene		ген белка NS1 NS1 protein gene	
H N	A	H N	A	H N	A	H 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

Примечание. Н — нуклеотидная замена; А — аминокислотная замена. Позиция нуклеотидной или аминокислотной замены указана от начала гена.

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.

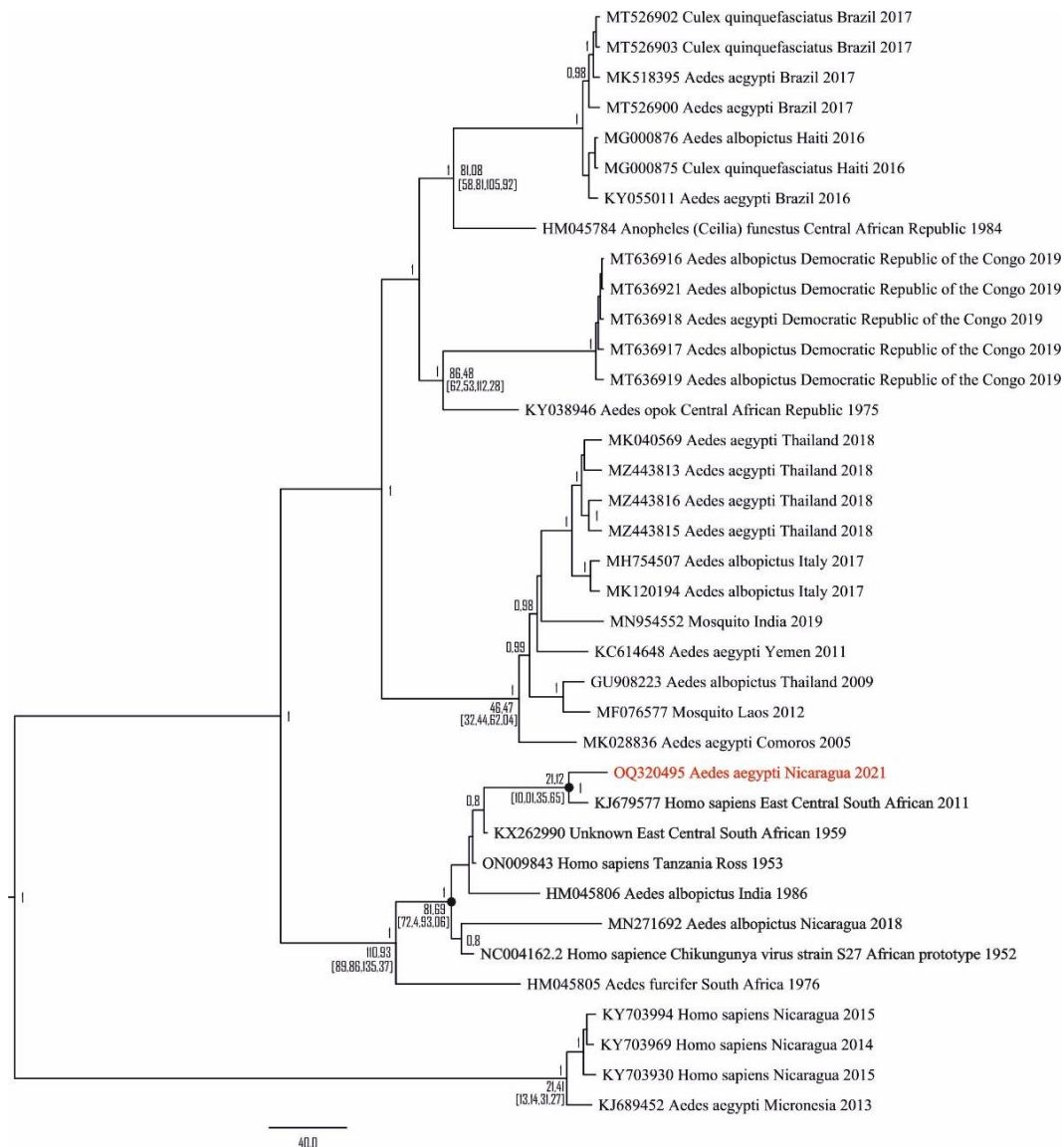


Рис. 2. Филогенетическое дерево фрагментов генома E2, 6K, E1 ВЧ.

В узлах дерева отмечена апостериорная вероятность > 0,75 и возраст группы. Выделен исследуемый вирус. Шкала показывает длину ветвей в годах.

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.

При анализе нуклеотидных и аминокислотных замен они в большей мере не соответствовали обычно изучаемым заменам, характерным для изучаемого региона [7]. Такие существенные различия могут быть связаны с тем, что основная масса изолятов ВЧ была выделена другими авторами из сывороток крови больных людей и в редких случаях — из комаров. Кроме того, основные изоляты, выделенные из комаров, были отловлены в городских агломерациях и редко — в удалённых от городов локациях, что было реализовано в настоящей работе. Различия в нуклеотидных последовательностях изолятов ВЧ во всех 4 генах можно объяснить также разной

локацией отловленных комаров и разным видом комаров, в которых был выявлен вирус.

Таким образом, при выделении изолятов вирусов из комаров видов *Aedes* spp., *Culex* spp. и *Culiseta* spp., отловленных в лесах Никарагуа, были обнаружены ВЧ и вирусы денге 1-го и 2-го типов. Анализ некоторых генов ВЧ показал высокое генетическое разнообразие между вирусом, выделенным из комаров вида *A. albopictus* и *A. aegypti*.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей (рис. 2) показал, что наиболее близким родственником изолированного ВЧ является вирус, выделенный от человека в Африке в

2011 г. (номер GenBank KJ679577). Предполагаемое время жизни общего предка этих штаммов составляет 21 год (95% HPD 10–35). Также исследуемый изолят вошел в кластер с прототипными штаммами, выделенными в 1952–1986 гг. в Танзании и Африке.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. 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>
2. 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>
3. 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>
4. 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>
5. 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>
6. Lundstrom J.O., Hesson J.C., Schafer M.L., et al. Sindbis virus polyarthritits 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>
7. 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>
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 Чикунгуния 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.ES.2021.26.19.2000063>
14. Отрашевская Е.В., Казакова Е.В., Жиренкина Е.Н. и др. Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгуния 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>

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», Манагуа, 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 ИСМЖЕ, 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

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



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.

Заключение. 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/ytvpaq>
- 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>

Печелюшко 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

Научная статья

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

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}¹Национальный 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>

Monitoring of respiratory viral infections in Moscow during 2011–2022

Elizaveta N. Vetrova^{1✉}, 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 RVs 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 named after 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>

Введение

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) ежегодно составляют около 90% регистрируемых инфекций. В мире, по данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируют 2–5 млн случаев ОРВИ с летальными исходами в диапазоне от 290 000 до 650 000 [1]. В России, по данным Роспотребнадзора, ежегодно выявляют 27,3–41,2 млн случаев [2, 3]. При этом 99% ОРВИ

диагностируют у детей до 5 лет преимущественно в развивающихся странах [4]. Среди ОРВИ преобладает заболеваемость гриппом: 5–20% — у взрослых и 20–30% — у детей [5]. Респираторные вирусы (РВ) проникают воздушно-капельным путём в дыхательный тракт, реплицируются в клетках эпителия и поражают другие органы и ткани, вызывая повышение температуры тела, головную боль, насморк, боль в горле и кашель. Помимо лихорадоч-

ных форм ОРВИ, описаны осложнения в форме энцефалитов, параличей и летальных исходов [6]. Особенности течения ОРВИ и возможных осложнений определяются свойствами РВ (репродуктивной активностью, вирулентностью, патогенностью), врождённой неспецифической резистентностью и специфическим иммунитетом хозяина [7, 8]. Частые ОРВИ свидетельствуют о нарушениях врождённой резистентности и специфического иммунитета.

Поскольку симптомы ОРВИ сходны, то детекция РВ с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) является наиболее специфичным, чувствительным и широко применяемым методом наряду с мультиплексным иммунофлуоресцентным анализом и выделением инфекционных штаммов в перmissive культурах клеток [4]. Однако феногенетическая вариабельность вирусов, обусловленная спонтанным мутагенезом, генетическими перестройками квазивидов РНК-содержащих вирусов, реассортацией сегментированных геномов, а также отсутствием вирусных и клеточных систем репарации РНК, затрудняет разработку диагностических систем и является причиной ложноотрицательных результатов и неидентифицированных этиологических агентов ОРВИ.

В настоящее время известно более 200 видов вирусов, вызывающих респираторные заболевания, с учётом различных серотипов общее число достигает 300 [9]. Из них наиболее распространены 8 семейств вирусов:

- ДНК-содержащие вирусы *Adenoviridae* (более 50 типов аденовирусов), *Parvoviridae* — бокавирус (2 типа);
- РНК-содержащие вирусы *Ortomyxoviridae* — вирус гриппа (типы А, В, С), *Paramixoviridae* — вирус парагриппа (4 типа);
- метапневмовирус (типы А, В);
- *Pneumoviridae* — респираторно-синцитиальный вирус (2 типа);
- *Coronaviridae* — коронавирусы (5 типов);
- *Picornoviridae* — риновирусы (более 100 типов);
- энтеровирусы (более 90 типов);
- *Reoviridae* — реовирус [6, 10].

Отмечен рост долей вирусных и вирусно-бактериальных ассоциаций. Относительные частоты детекции возбудителей ОРВИ варьируют в зависимости от географической локализации, возраста больных, способов сбора клинических образцов, длительности исследования и методов идентификации патогена [10].

В период пандемии COVID-19 карантинные меры, социальное дистанцирование и широкое применение лицевых масок ограничили распространение всех респираторных инфекций. Отме-

чено снижение доли образцов, положительных в ОТ-ПЦР-РВ на ОРВИ, с 49,8% (2018–2019) до 39% (2019–2020) и затем до 13,4% (2020–2021) [11].

Цель данной работы состояла в исследовании возбудителей ОРВИ в Москве в 2011–2022 гг. с помощью ОТ-ПЦР-РВ.

Материалы и методы

Мазки носоглотки 3908 пациентов, собранные не позднее 7-го дня от начала ОРВИ в период с 2011 по 2022 г., были любезно предоставлены руководителем инфекционного отделения д.м.н. Л.В. Колобухиной (Инфекционная клиническая больница № 1 г. Москвы) и д.м.н., профессором М.С. Савенковой (Морозовская детская городская клиническая больница и Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва) при наличии информированного согласия пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 18 от 21.02.2022).

РВ определяли посредством ОТ-ПЦР-РВ с использованием тест-систем, разрешённых приказами Росздравнадзора. Выделение суммарных нуклеиновых кислот проводили посредством лизиса клинических образцов в растворе гуанидинизотиоцианата с последующим спиртовым осаждением с использованием комплекта реагентов «Проба-НК» («ДНК-технология»). Для обратной транскрипции со случайным гексамерным олигодезоксирибонуклеотидом применяли комплект реагентов «Реверта-Л» («АмплиСенс»). Для определения РНК респираторно-синцитиального вируса (hRSv), метапневмовируса (hMpv), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4-го типов (hPiv), коронавируса человека (hCoV), риновирусов человека (hRv), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (hAdv), бокавируса человека (hBov) применяли набор «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL»; РНК вирусов гриппа А (INF-A) и В (INF-B) (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) — набор «Амплиценс Influenza virus A/B-FL»; РНК коронавируса SARS-CoV-2 — набор «РеалБест РНК SARS-CoV-2» («ВекторБест») на амплификаторах планшетного типа ДТ-32 и ДТ-lite («ДНК-технология»). При одновременной детекции фрагментов геномов более одного РВ в мазке носоглотки вирусные инфекции считали сочетанными (смешанными).

Проведён анализ 3908 мазков носоглотки (по 1 от каждого пациента), собранных в Москве. Детекцию РНК SARS-CoV-2 проводили только в 2022 г. вследствие изоляции больных COVID-19 от пациентов с ОРВИ в стационарах в 2020–2021 гг. и необходимости дополнительного санитарно-эпидемиологического заключения для проведения работ.

Статистический анализ распределения РВ проводили с применением программного обеспечения

«Microsoft Excel». Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ [12].

Результаты

Для анализа распределения возбудителей ОРВИ обследовано 3908 пациентов в Москве в период с 2011 по 2022 г. Частоты детекции респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа, сезонных коронавирусов, риновирусов, аденовирусов, бокавируса, вирусов гриппа А и В, сочетанных инфекций при обнаружении не менее 2 РВ в образце и неидентифицированных образцов в 2011–2022 гг. представлены в **табл. 1**.

В течение 12 лет наблюдений относительные частоты каждого возбудителя ОРВИ варьировали. До пандемии COVID-19 в 2011–2020 гг. преобладали три респираторных вируса (INF-A, hRSv и hRv), затем их относительные частоты существенно снизились. Несмотря на массовую иммунизацию против гриппа населения Москвы с 2017 г. трёхвалентными и четырёхвалентными вакцинами от гриппа, содержащими штаммы INF-A и INF-B, частоты детекции вируса гриппа А в мазках носоглотки больных ОРВИ оставались высокими до 2020 г. Значительное снижение доли вируса гриппа А наблюдали только в 2021–2022 гг., что, вероятно, могло быть обусловлено как карантинными мерами и масочным режимом, так и охватом вакцинацией против гриппа более половины населения России [5]. Необходимо отметить несинхронные и неоднаправленные изменения долей вирусов гриппа А и В.

Частоты детекции INF-B оставались в диапазоне от 0,5 до 4,4% в течение всего периода наблюдений с единственным исключением с подъёмом доли вируса гриппа В до 8,3% в 2016 г.

Высокая частота встречаемости SARS-CoV-2 (31,7%) зарегистрирована в 2022 г., несмотря на неспецифическую и специфическую профилактику, а также санитарно-просветительную работу. Применение векторных вакцин от COVID-19, в частности, вакцины «Спутник-V» на основе аденовирусов Ad5 и Ad26, не привело к значительному снижению доли аденовирусов в общей этиологической структуре заболеваемости ОРВИ в Москве (табл. 1). При отсутствии вакцин от большинства ОРВИ относительные доли остальных изучаемых РВ оставались минорными. Максимальная частота hMPv (13,4%) была зарегистрирована в 2011 г., а в последующие годы не превышала 7%. Отмечен рост частоты смешанных инфекций, что могло быть обусловлено как нарушениями врождённого и адаптивного иммунитета среди пациентов, так и независимым распространением и увеличением репродукции вирусов.

За последние годы доля неидентифицированных образцов среди больных ОРВИ с клиническими симптомами выросла до 28,5% (табл. 1), что свидетельствует о неполном соответствии лицензированных диагностических тест-систем и циркулирующих возбудителей респираторных инфекций, о генетическом разнообразии штаммов известных вирусов и о возможном появлении новых возбудителей.

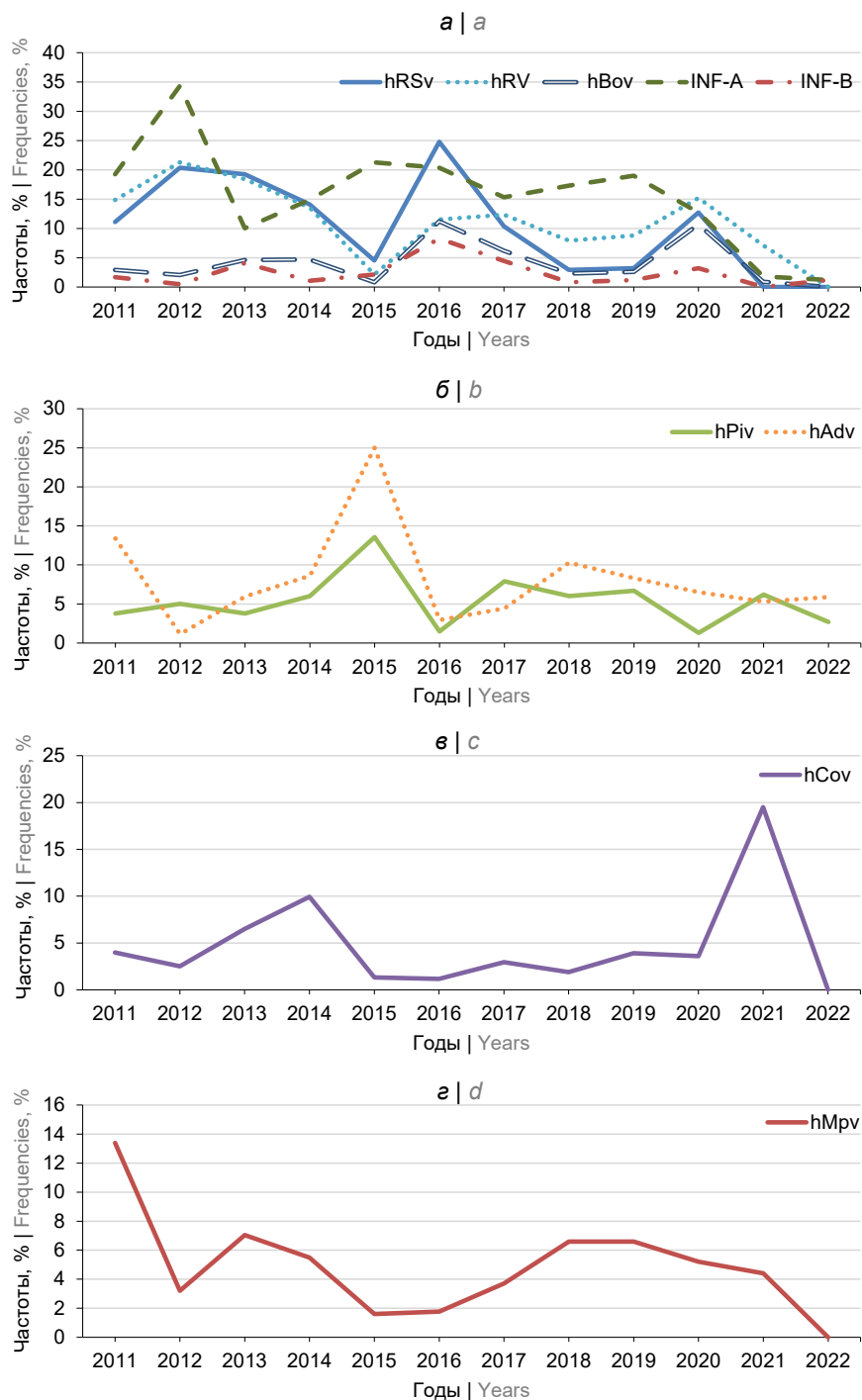
Таблица 1. Мониторинг возбудителей ОРВИ в Москве в 2011–2022 гг. методом ОТ-ПЦР-РВ, частота встречаемости, % от общего числа образцов

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

Вирус Virus	Год Year											
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Количество исследованных образцов 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

Примечание. Mix — сочетанные инфекции; N/I — неидентифицированные образцы.

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



Динамика распространения РВ в 2011–2022 гг.

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

Анализ динамики распространения возбудителей ОРВИ показал высокие коэффициенты корреляции (r) между hRSv и hRv ($r = 0,77$), hRSv и hBov ($r = 0,66$); hRSv и INF-B ($r = 0,64$); hRSv и INF-A ($r = 0,52$); hBov и INF-B ($r = 0,79$), что предполагает существование единой группы РВ (рисунок, а; табл. 2). Вторая группа РВ со сходной динамикой распространения включала hPiv и hAdv с $r = 0,70$ (рисунок, б; табл. 2).

На основании корреляционного анализа динамики распространения (табл. 2) выделены 4 группы РВ (рисунок). Однонаправленные изменения обнаружены для 5 РВ, включая респираторно-синцитиальный вирус, риновирусы, бокавирус, вирусы гриппа А и В. Максимальные значения частот детекции hRSv и hRv человека зарегистрированы в 2012, 2016 и 2020 гг., что предполагает циклические изменения с подъёмами каждые 4 года. Для INF-A высокие ча-

Таблица 2. Коэффициенты корреляции динамики частот РВ
Table 2. Correlation coefficients of the dynamics of RVs frequencies

Вирус 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

Примечание. Курсивом выделены значения, соответствующие высоким коэффициентам корреляции ($r \geq 0,43$); жирным шрифтом — данные, соответствующие коэффициентам корреляции $r \approx 0$.

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

стоты встречаемости обнаружены в 2012, 2015–2016 и 2019 гг. От этой группы отличается сходная, но не идентичная динамика для другой группы, состоящей из hAdv и hPiv, с максимумом в 2015 г. (рисунок, б). Для сезонных коронавирусов низкие коэффициенты прямой и обратной корреляции (табл. 2) свидетельствовали о независимом распространении с пиками в 2014 и 2021 гг. (рисунок, в). Частоты детекции hMpv также не совпадали с другими группами с максимумом в 2011 г. и последующими колебаниями на относительно низком уровне (рисунок, г).

Сравнительный анализ среднегодовых значений частот РВ в 5 городах России (Москва, Екатеринбург, Казань, Ростов-на-Дону, Санкт-Петербург) в 2014–2018 гг., в Москве в 2011–2022 гг. и

в мире (табл. 3) показал доминирование 3 видов РВ: INF-A, hRv и hRSv. Доминирование РВ в мире не зависело от специфической профилактики, поскольку существующие вакцины против гриппа включают штаммы INF-A и INF-B, вакцины против других ОРВИ находятся на стадии клинических испытаний и не применяют для массовой иммунизации населения. Минимальные среднегодовые частоты выявлены для hMPV как в мире, так и в большинстве регионов России, за исключением Санкт-Петербурга (табл. 3). При этом доля hMPV в Санкт-Петербурге (3,0%) была сравнима с другими областями России. Также в большинстве российских городов редко детектировали hBov, но мировые тренды не известны [4].

Таблица 3. Сравнение среднегодовых значений частот распространения вирусных инфекций в России и в мире, %
Table 3. Comparison of annual mean frequencies of viral infections in Russia and in the world, %

Вирус Virus	Россия Russia						Мир World [4]
	Москва Moscow		Екатеринбург Ekaterinburg [13]	Казань Kazan [13]	Ростов-на-Дону Rostov-on-Don [13]	Санкт-Петербург 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

Примечание. Жирным шрифтом выделены ячейки, соответствующие доминирующим видам РВ в Москве, регионах РФ и в мире.

Note. Cells corresponding to the dominant RV species in Moscow, region of the Russian Federation and in the world are marked with bold.

ОТ-ПЦР-РВ позволяет получить количественные оценки геном-эквивалентов в реакционной смеси. Однако клинические образцы носоглоточных мазков не стандартизованы, что исключает возможность пересчёта количеств вирионов в единице объёма или в клетке хозяина. Низкие вирусные нагрузки являлись особенностью результатов ОТ-ПЦР-РВ мазков носоглотки больных ОРВИ.

Обсуждение

ОРВИ опасны вследствие повсеместного распространения, круглогодичной циркуляции, высокой контагиозности и риска осложнений, включая пневмонии, острую дыхательную недостаточность, инфекционно-токсический шок, менингиты, энцефалиты, параличи, острый дистресс-синдром, а также сопутствующие хронические заболевания — бронхиальную астму, хроническую обструктивную болезнь лёгких, заболевания печени, почек, сердечно-сосудистой системы, приводящие к летальным исходам [9]. Поэтому мониторинг распространения этиологических агентов ОРВИ необходим для совершенствования диагностических систем, контроля их соответствия современным РВ, для оценки рисков инфицирования населения в различных регионах и социально-демографических группах, необходимости разработки вакцин и их экономически обоснованного масштабного применения.

Сравнительный анализ распространения РВ в Москве показал периодические вариации с сохранением доминирования трех видов: INF-A, hRSv и hRV, что соответствовало спектрам возбудителей ОРВИ в 5 городах России [13, 14] и во всём мире [4] (табл. 3) вследствие глобализации и определяло необходимость общих мер профилактики, диагностики и лечения. Анализ динамики распространения РВ в Центральной Европе в течение 10 лет также свидетельствует о выявлении вирусов гриппа почти в половине образцов вне зависимости от иммунизации против гриппа и карантинных ограничений в период пандемии COVID-19 [15]. Несмотря на сообщения о росте доли вируса гриппа В в 2019–2022 гг. в России и в других странах [5, 16], результаты мониторинга РВ в Москве (табл. 1) не показали изменений структуры доминирования. На фоне значительного снижения частоты INF-A за последние годы роста доли INF-B не обнаружено. Одной из возможных причин является охват населения Москвы вакцинацией против гриппа А и В. В России постановлением главного государственного санитарного врача для сезона 2020–2021 гг. поставлена задача охвата прививками против гриппа не менее 60% населения и 75% граждан групп риска [17]. Начиная с 2017 г. в России вакцинируют более 40% населения ежегодно, в 2019 г. — 50,5% населения [5], в 2020 г. произошло снижение до 41,2%, при этом только 6,9% детей с лабораторно подтверждённым

гриппом нуждались в стационарном лечении [17]. В 2020 г. в результате иммунизации отечественной сезонной трёхвалентной инактивированной вакциной показаны: уменьшение уровней антител ко всем компонентам вакцины в 2,6–3,5 раза ниже защитного уровня (титр в реакции торможения гемагглютинации < 1/40) через 6–7 мес после вакцинации, свидетельствующее о нестабильности поствакцинального противогриппозного гуморального иммунитета; зависимость от возраста вакцинируемых лиц (среди детей 3–14 лет более активный ответ по сравнению с лицами старшего возраста, несмотря на незрелость иммунной системы детей); недостаточная иммуногенность вакцинных компонентов вирусов гриппа В, что приводило к росту частоты встречаемости вируса гриппа В среди возбудителей ОРВИ (табл. 1) и росту заболеваемости гриппом В, и обратная корреляция между уровнем предсуществующих антител к вирусам гриппа и секрецией антител к новым вакцинным штаммам, что обусловлено известным эффектом «первородного антигенного греха» [18]. Необходимо отметить рост заболеваемости гриппом до максимального значения в 2021 г. (в России — 14,96 на 100 тыс. населения; в Москве — 65,99 на 100 тыс. населения) во время пандемии COVID-19 при иммунной прослойке более 60% с доминированием антител к вирусу гриппа В. Сохранение вируса гриппа А в водной среде, среди млекопитающих и птиц водного и околоводного комплекса обуславливает риски возникновения новых мутантных вариантов, ускользающих от иммунного ответа [19].

Мониторинг распространения РВ в Японии показал периодические изменения частот hRSv с временным уменьшением во время пандемии COVID-19 аналогично нашим наблюдениям (табл. 1; рисунок, а) и высокие частоты встречаемости hRV [20]. Скрининг РВ методом ОТ-ПЦР-РВ в 26 регионах России в 2020 г. показал максимальную частоту детекции риновируса 7,32% как в межэпидемический период, так и в начале эпидемического сезона [21, 22], что соответствовало значительной доле риновирусов в этиологической структуре ОРВИ в Москве в 2020 г. (табл. 1). Доля серопозитивных к риновирусу лиц в начале 2022 г. составляла 77,8% [16], что могло быть обусловлено высокими частотами распространения риновируса человека в предыдущие 2 года (табл. 3). В Санкт-Петербурге для преобладающих видов hRSv и hRV выявлена сезонная цикличность циркуляции [14]. Наблюдаемые отличия частот, возможно, определяются ограниченностью исследуемых выборок, географическими и социально-демографическими отличиями, являются следствием отсутствия стандартизации способов забора мазков носоглотки, нестабильности вирусных геномных РНК при хранении и быстрой эволюционной изменчиво-

сти РВ. В настоящее время разрабатываются дополнительные методы мультиплексного анализа для мониторинга РВ с высокой чувствительностью и специфичностью на основе микрофлюидных технологий, биосенсоров, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией и др. [23]. Кроме традиционных лабораторных методов предложено использовать компьютерные технологии Internet-of-Things, которые посредством анализа больших объёмов данных о поведении человека и окружающей среде с использованием математических и статистических моделей повышают вероятность выявления эпидемических вспышек на ранних этапах [23].

Вирусы парагриппа в 2020 г. в России встречались с одинаковыми частотами как в межэпидемический период (1,09%), так и в начале эпидемического сезона (1,05%). Распространённость остальных возбудителей ОРВИ и вирусов гриппа А и В в среднем по России не превышала 1% [21]. В 2021–2022 гг. частота распространения SARS-CoV-2 составляла 15%, коронавирусов человека — 12%, доля остальных — от 0,05 до 9% [22].

В 2020–2021 гг. при низкой активности вирусов гриппа установлено возрастание этиологической роли бокавируса и метапневмовируса при уменьшении частоты выделения вирусов парагриппа, аденовирусов, риновирусов и респираторно-синцитиального вируса [24]. Полученные нами данные (табл. 1) также свидетельствуют о существенном увеличении частоты распространения бокавируса до 10,7% в 2020 г. Для метапневмовируса был зарегистрирован пик распространённости в предшествующие 2018–2019 гг. с последующим плавным снижением (табл. 1). Частоты детекции hAdv зависят от исследуемой выборки, поскольку аденовирусная инфекция распространена преимущественно в организованных коллективах [14].

Несмотря на все меры неспецифической и специфической профилактики COVID-19 в 2020–2022 гг., доля образцов, содержащих SARS-CoV-2, составила 31,7% в 2022 г. (табл. 1). При этом сезонные коронавирусы в отсутствие других респираторных вирусов не выявлены, хотя в 2021 г. их доля составляла 19,5%. Возможные причины состоят в феногенотипической изменчивости РНК-содержащих коронавирусов четырех родов: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*, среди которых у людей с признаками ОРВИ обнаружены α -коронавирусы HCoV-229E и HCoV-NL63, β -коронавирусы HCoV-OC43, HCoV-NKU1, ускользание мутантных вариантов вирусов от иммунного ответа хозяина и сохранение вирусов в окружающей среде, среди диких резервуарных хозяев, домашних и сельскохозяйственных животных. Природным резервуаром *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* являются рукокрылые, птицы, млекопитающие, рыбы.

У домашних птиц и свиней выявлена персистирующая инфекция с выделением вируса в составе фекалий [19]. Помимо широкой встречаемости коронавирусов у людей во всём мире, что подтверждается ретроспективным серологическим анализом, они распространены среди летучих мышей: уровень гомологии аминокислотных последовательностей SARS-CoV-2 и RaTG13 (коронавируса от летучих мышей и рептилий) — 97% [25]. Известно, что стабильность паразитарных систем обеспечивается разнообразием резервуарных хозяев, отличиями их популяционной динамики [26] и сохранением жизнеспособных вирусов в окружающей среде. Для оценки эпидемиологических рисков предлагается мониторинг РВ методом ОТ-ПЦР-РВ с высокой чувствительностью и специфичностью не только в клинических образцах (табл. 1, 2; рисунок), но и в аэрозолях [27].

Специфический иммунный ответ, индуцируемый вакцинами, приводит к селекции новых вариантов квазивидов РНК-содержащих вирусов, устойчивых к нейтрализации специфическими антителами, и вызывает ускорение молекулярной эволюции вирусов.

В отсутствие вакцинопрофилактики большинства минорных ОРВИ их относительные доли остаются стабильно низкими (табл. 1, 2), и новые опасные варианты вируса не имеют селективных преимуществ. Длительная совместная эволюция человека и большинства РВ привела к ослаблению патогенных свойств, снижению вирусных нагрузок и выживанию хозяев для успешной репродукции и распространения вирусов.

За 12 лет наблюдений отмечен рост доли неидентифицированных клинических образцов от пациентов с симптомами ОРВИ от 1,2 до 28,5%, что могло быть обусловлено бактериальными респираторными инфекциями со сходными симптомами и/или генетическими отличиями праймеров и зондов для ОТ-ПЦР-РВ от геномов вирусов, циркулирующих в настоящее время. Высокие частоты смешанных инфекций в диапазоне 7,8–33,4% могут быть следствием отсутствия интерференции вирусов при репродукции в клетках человека, независимой репродукции РВ и/или иммунодефицитами у населения Москвы. Корреляционный анализ динамики распространения РВ (табл. 3) показал значимую взаимозависимость для 5 из 9 исследованных возбудителей ОРВИ, включая все 3 доминирующих вида — INF-A, hRSv и hRv, а также INF-B и hBov (рисунок, а). Сочетанные инфекции РВ с преобладанием коинфекции риновирусами и бокавирусом с высокими коэффициентами корреляции отмечают и при длительном мониторинге в Центральной Европе [15]. Вторая группа включала hAdv и hPiv ($r = 0,7$) с пиком в 2015 г. (рисунок, б). Характерно отсутствие значимой корреляции динамики распространения сезонных коронавирусов

(табл. 2; рисунок, в) и метапневмовируса (рисунок, з) с другими анализируемыми РВ. Для анализа корреляции динамик распространения сезонных hCoV (рисунок, в), SARS-CoV-2 и других РВ [20] необходим дальнейший мониторинг. Циклические подъёмы и спады частот встречаемости РВ, возможно, обусловлены закономерными изменениями иммунной прослойки населения при варьировании частот распространения возбудителей ОРВИ.

Наблюдаемые частоты смешанных инфекций двумя или тремя РВ превышали теоретически ожидаемые в предположении о независимом распространении патогенов, что свидетельствовало об отсутствии интерференции между большинством РВ, возможно, вследствие дефектов системы интерферонов у больных ОРВИ.

Необходимо отметить, что доля лиц, инфицированных РВ без симптомов ОРВИ, составляет 0,25–6,09% численности популяции. Бессимптомные вирусоносители вовлечены в циркуляцию РВ и рост заболеваемости [22, 27].

Заключение

В 2011–2022 гг. в Москве зарегистрированы перестройки этиологической структуры ОРВИ с сохранением 3 доминирующих видов: вируса гриппа А, респираторно-синцитиального вируса и риновирусов человека. В период ограничительных мер неспецифической профилактики и массовой иммунизации против COVID-19 значительно возросла доля сезонных коронавирусов, возможно, за счёт α-коронавирусов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. WHO. World Health Organization fact sheet: Influenza (Seasonal). Geneva; 2021.
2. Львов Н.И., Лихопоев В.П. *Острые респираторные заболевания. Руководство по инфекционным болезням*. СПб.; 2011:7–122. Lvov N.I., Likhopoev 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., Федосеев М.В., Калюжная Т.А. Актуальные вопросы вакцинопрофилактики гриппа. *Вопросы современной педиатрии*. 2021;20(4):333–7. Shakhaktinskaya 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/rveqjh>
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/rjoikd>
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. дисс. ... 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/sllvnj>
15. Horemheb-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., Свиницкая 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., Maierova 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. Яцышина 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., Яцышина 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., Piiescu 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 quasispecies 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>

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 ИСМЖЕ, 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

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

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 сполитипированы.

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, сполитипирование, 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
В0/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
Т	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		Т	1		
52		Т	2		
53		Т	8		
73		Т	1		
131		Т	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. Toungousova 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].

Сполиготипирование 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 вариативность 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 вариативности 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

Окончание таблицы | End of the Table

№ 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 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)

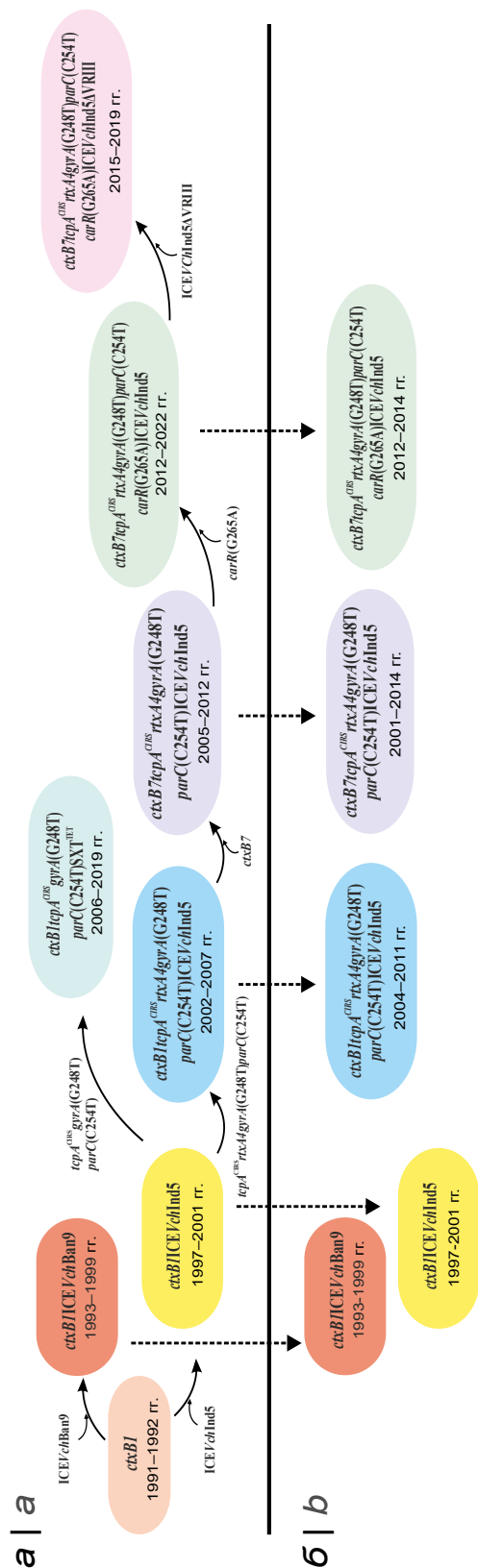


Рис. 1. Динамика изменения свойств штаммов генетических вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных на территории эндемичных по холере стран Азии и Африки (а) и России (б).

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

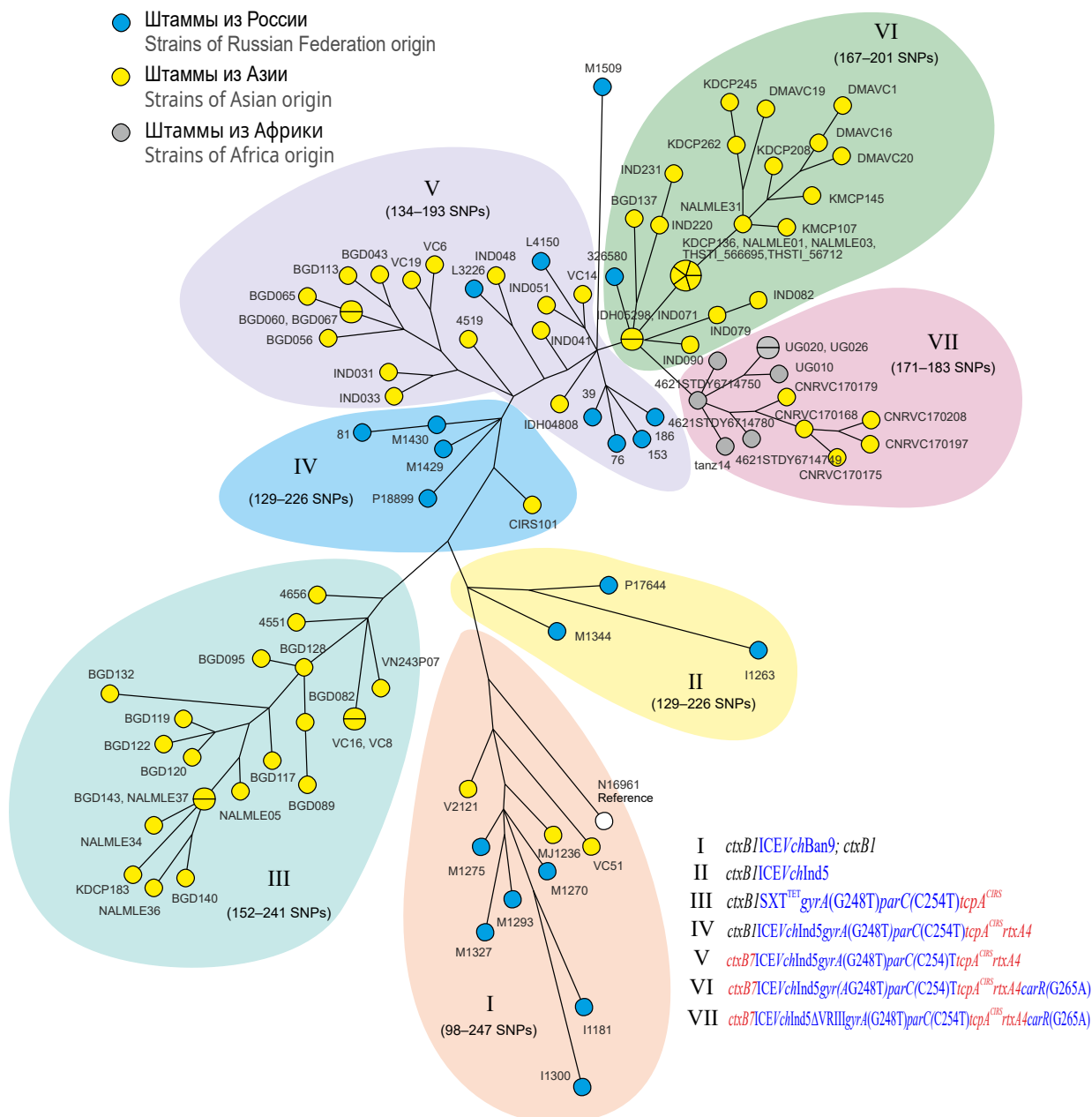


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов из кластеров I–VII генетических вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, построенное на основе полногеномного SNP-анализа.

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., Kutuyev 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 atopическим 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 сиквентов 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 сиквентов 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-

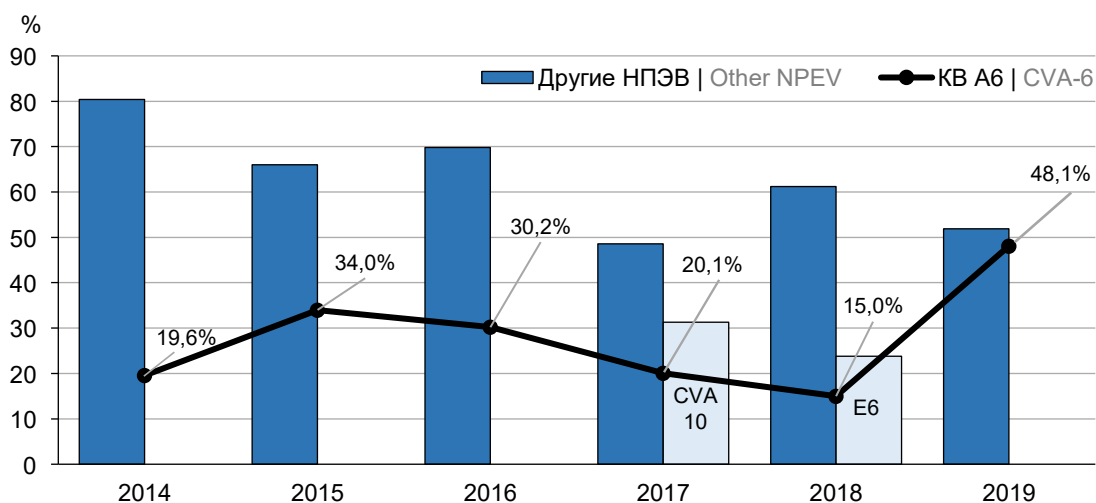


Рис. 1. Динамика обнаружения КВ-А6 в ДФО в 2014–2019 гг.

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

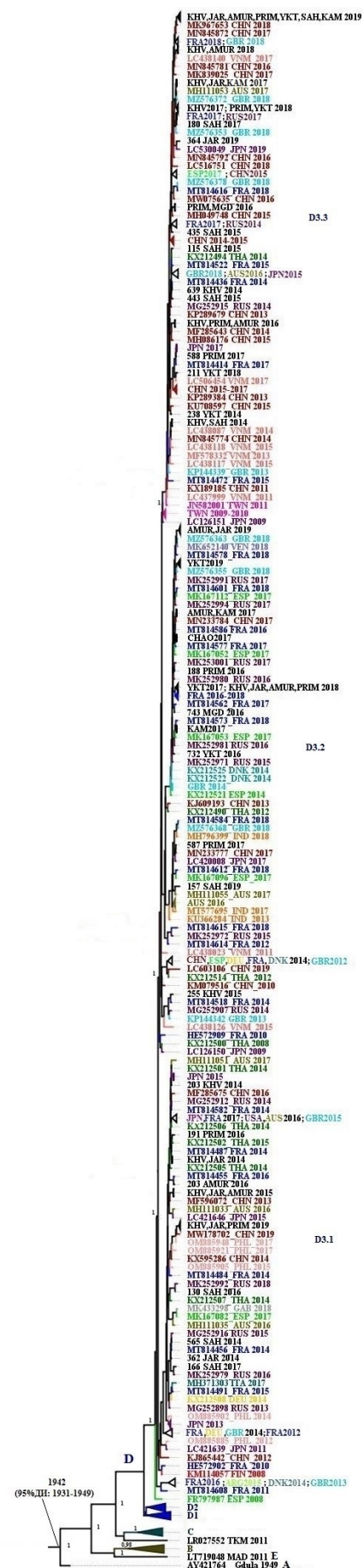
лись подъёмы заболеваемости ЭВИ, что позволяет предположить появление новых вариантов КВ-А6 на территории округа с вовлечением в эпидемический процесс неиммунного населения. Так, в 2014 г. в Республике Саха (Якутия) наблюдался рост заболеваемости ЭВИ по сравнению с предыдущим годом в 2,4 раза (2013 г. — 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. КВ-А6 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 КВ-А6 на геногруппы А, В, С, D, Е 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 КВ-А6, ответственные за большинство вспышек БКСР во всем мире за последние 15 лет [27–29]. Основываясь на этой классификации, дальневосточные штаммы КВ-А6 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 КВ-А6 составило 17,1%, между субгенотипами геногруппы D — 9,6%.

С помощью Байесовского коалесцентного анализа установлено, что самый недавний общий предок для КВ-А6 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 КВ-А6 оказались

Рис. 2. Филогенетическое дерево с максимальным доверием к кладам, построенное на основании анализа фрагментов капсидного белка VP1 КВ-А6 (774 н.о.).

Чёрным цветом выделены дальневосточные штаммы КВ-А6: 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 (E30) 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.

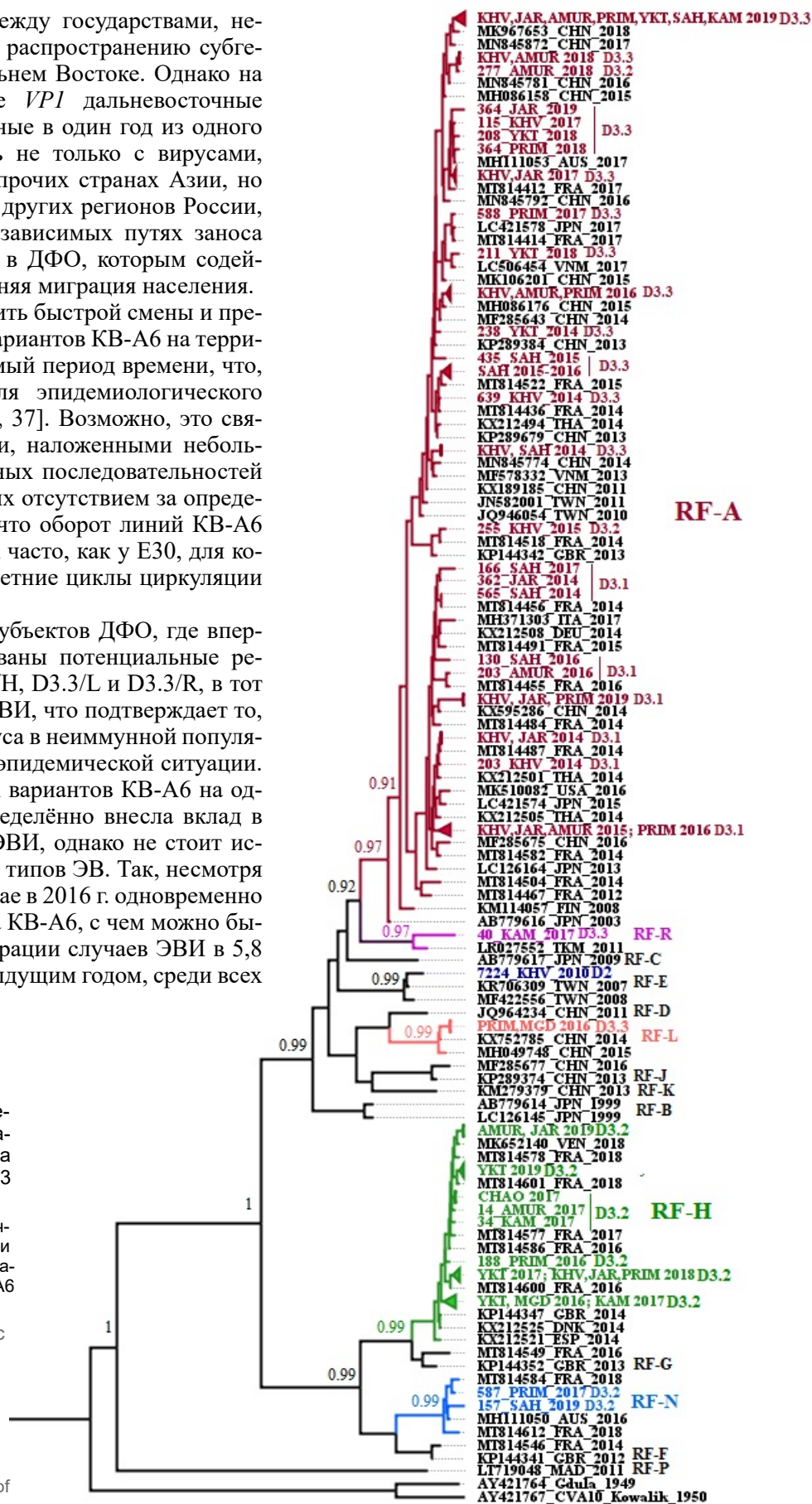
Нам не удалось выявить быстрой смены и преобладания тех или иных вариантов KB-A6 на территории ДФО в анализируемый период времени, что, например, характерно для эпидемиологического профиля ЭВ ЕСНО30 [36, 37]. Возможно, это связано как с ограничениями, наложенными небольшим количеством изученных последовательностей 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,

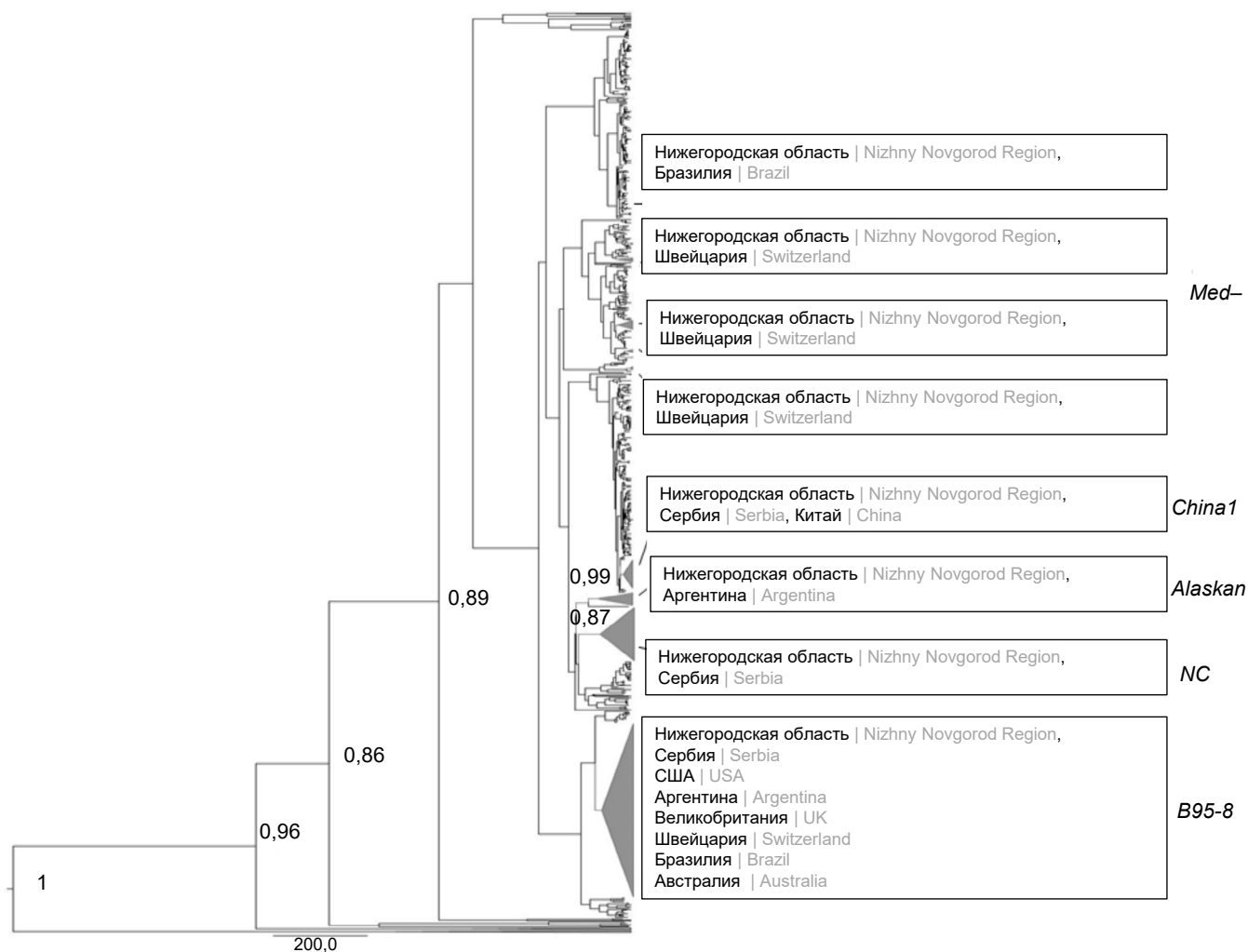


Рис. 1. Байесово филогенетическое дерево MCC, сконструированное на основе нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* нижегородских изолятов ВЭБ и последовательностей, полученных в различных регионах мира и доступных в GenBank.

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

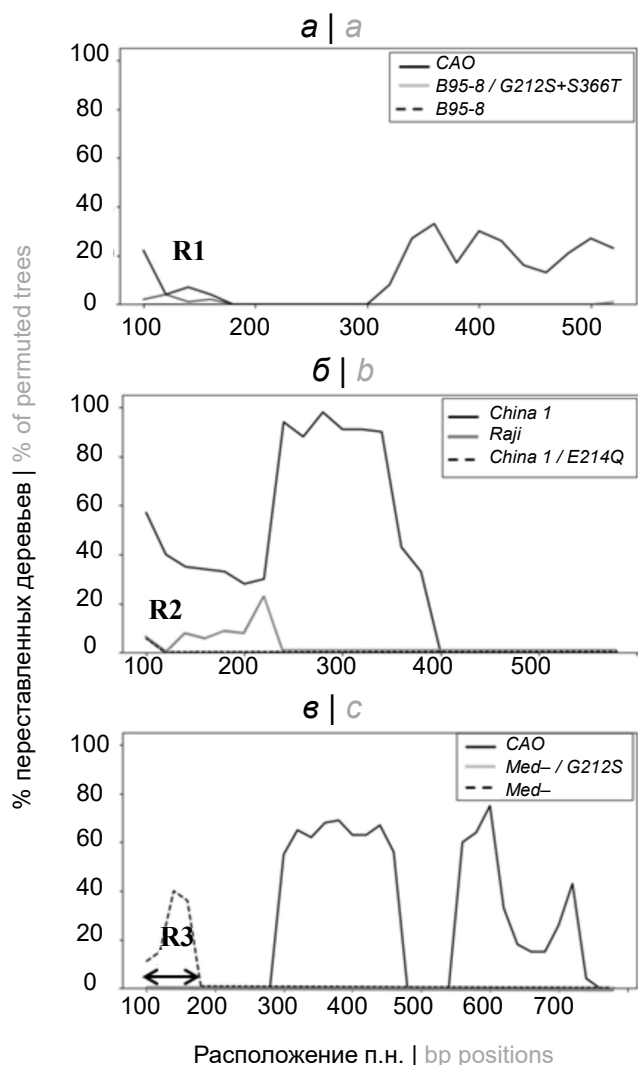


Рис. 2. Реконбинационный анализ нижегородских последовательностей.

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 Е3-лигазы, которая участвует в процессинге молекулы IкВ, являющейся супрессором NF-κВ [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. *Virology*. 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

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-417>

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 иммунологии. 2023;100(5):380–390. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-417> EDN: <https://www.elibrary.ru/uvszan>

Review

<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>

Введение

Stenotrophomonas maltophilia — грамотрицательный микроорганизм, который широко распространён в природе и часто выделяется из водных источников, почвы, образцов растительного и животного происхождения [1]. Согласно классификатору Берджи¹ род *Stenotrophomonas* включает три вида. Современные же альтернативные таксономические ресурсы причисляют к данному роду по меньшей мере 19 видов, которые демонстрируют широкое многообразие метаболических путей, а также генетическую и фенотипическую гетерогенность как внутри рода, так и между штаммами каждого отдельно взятого вида [2–4].

S. maltophilia хорошо адаптирована к существованию в различных условиях обитания, включая среды с низким содержанием питательных субстратов, способна утилизировать большой спектр источников углерода (включая трихлорэтилен, бензин, хлороформ) и обладает природной устойчивостью к солям тяжёлых металлов [5, 6].

S. maltophilia является условно-патогенным (оппортунистическим) агентом, обладающим природной множественной лекарственной устойчивостью к широкому спектру антибиотиков. Микроорганизм ассоциирован с рядом серьёзных заболеваний и выделяется при респираторных, урологических инфекциях, бактериемии, эндокардитах и др. [7]. Бактерия представляет интерес и как активный член полимикробных бактериальных сообществ, который воздействует на метаболизм окружающих микроорганизмов, в том числе путём антагонистического подавления представителей других видов (межвидовой антагонизм). Яркий пример такого сообщества наблюдается при муковисцидозе, где *S. maltophilia* колонизирует респираторный тракт пациентов и часто сосуществует с *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cenocepacia*, микобактериями нетуберкулёзного комплекса и др. [8, 9].

Патогенетический базис бактерии определяется факторами вирулентности — молекулярными структурами, обеспечивающими развитие инфекционного процесса. *S. maltophilia* обладает достаточно широким спектром факторов вирулентности (или факторов, потенциально связанных с вирулентностью), в число которых входят поверхност-

¹ Palleroni N.J. *Stenotrophomonas* // *Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria*. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01237>

ные структуры бактериальной клетки (липополисахариды (ЛПС), пили/фимбрии и флагеллы (жгутики), продукция внеклеточных энзимов (в частности, протеаз, эластаз, липаз, ДНК- и РНКаз, фибринолизина), способность формировать биоплёнки на абиотических поверхностях и на тканях макроорганизма и осуществлять секрецию во внешнюю среду малых молекул через QS-системы (quorum sensing), получившие название «диффузный сигнальный фактор» (diffusible signal factor — DSF) [6, 11].

Адгезины как фактор вирулентности

Ключевым этапом первоначального взаимодействия «микроорганизм–хозяин» служит адгезия — присоединение бактерии к клеткам ткани макроорганизма. Уже на фазе адгезии бактерии иницируют собственные биохимические процессы, направленные на пролиферацию, инвазию, секрецию токсинов и активацию ответных сигнальных каскадов клеток хозяина.

Бактериальные факторы адгезии (адгезины) представлены белками и ЛПС. Белковые адгезины подразделяются на фимбриальные и афимбриальные. Липополисахаридные и полисахаридные адгезины ассоциированы с клеточной оболочкой (клеточной стенкой, наружной мембраной и капсулой). Следует отметить, что функции ЛПС в патогенезе не ограничиваются первичным взаимодействием «бактерия–макроорганизм»: их значимая роль сохраняется и на последующих этапах инфекционного процесса.

ЛПС (эндотоксин) *S. maltophilia* состоит из липида А, корового олигосахарида и О-антигена (О-полисахарида) [12, 13]. Липид А в составе ЛПС является потенциальным индуктором продукции макрофагами фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), что было продемонстрировано V.J. Waters и соавт. на мышинной модели [14]. Несмотря на относительно невысокую инвазивность *S. maltophilia*, уровень ФНО- α после стимуляции клеточной линии макрофагов RAW очищенным липидом А *S. maltophilia* был значительно выше уровня, полученного при стимуляции липидом А, выделенным из референсного штамма *P. aeruginosa* PAO1 [14]. Коровые олигосахариды играют важную роль в формировании структуры ЛПС, а следовательно, и вирулентности. Для многих микроорганизмов установлено, что дефектные формы коровых олигосахаридов приводят к существенному снижению вирулентности или возникновению авирулентных штаммов, например, *P. aeruginosa* [15] и *Bordetella bronchiseptica* [16]. Не менее важный вклад в формирование вирулентности вносят О-антигены, полная утрата которых или наличие дефектов в их структуре, обусловленных нарушением биосинтеза, может снижать вирулентность микроорганизма, что продемонстрировано, в частности, на видах *Burkholderia pseudomallei* [17], *P. aeruginosa* [15], *Brucella abortus* [18]. ЛПС раз-

личных штаммов *S. maltophilia* отличаются значительной гетерогенностью: известен по меньшей мере 31 вариант О-антигена [19].

В процессах метаболизма сахаров и включения их в ЛПС у *S. maltophilia* задействованы ряд генов. Ген *spgM*, кодирующий бифункциональный энзим фосфоглюкомутазу/фосфоманномутазу, аналогичен гену *algC*, ответственному за синтез алгината у *P. aeruginosa* [13, 20]. В биосинтезе О-антигена важная роль отводится двум оперонам: *rmlBACD* и *xanAB*. Т.Р. Huang и соавт., выполнив анализ SDS-PAGE очищенных ЛПС из штаммов *S. maltophilia* с мутациями в генах *rmlA*, *rmlC* и *xanB*, установили, что эти гены непосредственно участвуют в контроле биосинтеза О-антигена, а ген *xanB* также задействован в синтезе коровой компоненты ЛПС [21]. Авторами показано, что оба оперона также влияют на синтез продуцируемых *S. maltophilia* экзополисахаридов — ключевых составляющих биоплёнок.

Кроме поверхностных ЛПС, в стадии адгезии задействованы флагеллы (жгутики). *S. maltophilia* имеет от одной до нескольких флагелл, расположенных на полюсе(ах) бактериальной клетки, которые, в частности, способствуют первичному присоединению к клеткам слизистой трахеи мышей и индуцируют специфический иммунный ответ макроорганизма [22, 23]. При инфицировании мышей линии BALB/c очищенным флагеллином *S. maltophilia* через 4 ч у животных регистрировали повышенный уровень цитокинов: интерлейкинов (ИЛ) -1 β , -10 и ФНО- α . Также увеличивалось число нейтрофилов, лейкоцитов и моноцитов, что повышало неспецифическую защиту мышей как от *S. maltophilia*, так и от *Staphylococcus aureus* [24].

А. Pompilio и соавт. сравнивали тяжесть заболевания мышей при аэрозольном инфицировании диким штаммом *S. maltophilia* SM111 и мутантным вариантом (Δ *fliI*), лишённым флагелл. Авторы не обнаружили статистически значимых отклонений в потере животными массы, равно как и в повреждении лёгочной ткани и уровне смертности, хотя значения ФНО- α были выше у животных, инфицированных диким штаммом. В результате авторы сделали своеобразное предположение, что наличие флагелл (следовательно, и подвижность) могут быть не связаны с вирулентными свойствами *S. maltophilia* в патогенезе заболеваний лёгких [25]. Гипотетически допустимо, что при хронической инфекции микроорганизм, лишённый такого значимого иммуногенного фактора, как флагеллин, будет иметь преимущества за счёт снижения иммунного ответа хозяина, что, в частности, наблюдали у не продуцирующих флагеллы штаммов *P. aeruginosa* от пациентов с мукковисцидозом [26]. Однако большинство работ указывают на позитивную корреляцию между подвижностью и первичной адгезией, например [22, 23, 27].

По всей видимости, упомянутое выше предположение об отсутствии связи между наличием флагелл и вирулентными свойствами *S. maltophilia* может распространяться только на более поздние, хронические стадии инфекции, когда предшествующие заболеванию этапы адгезии микроорганизма уже пройдены.

Подвижность *S. maltophilia* и уровень экспрессии флагеллинов зависят от факторов внешней среды и контролируются сложной и не полностью изученной генетической системой. Достаточно давно установлено, что в регуляции экспрессии участвует циклический дигуанозинмонофосфат (с-di-GMP) — важная сигнальная молекула (вторичный мессенджер), контролирующая физиологию микроорганизма, его подвижность и процесс образования биоплёнок [28]. Высокая концентрация с-di-GMP в клетке ассоциирована со снижением подвижности [29].

Внутриклеточная концентрация с-di-GMP регулируется изменением активности двух классов энзимов: дигуанилатциклаз и фосфодиэстераз. Первые синтезируют с-di-GMP из 2 молекул гуанозинтрифосфата, а фосфодиэстеразы гидролизуют с-di-GMP до линейного дигуанозинмонофосфата или гуанозинмонофосфата (GMP) [30–32].

Для ряда микроорганизмов известны некоторые генетические детерминанты, так называемые мастер-регуляторы и их гомологи, которые инициируют и регулируют экспрессию генов флагеллинов, например, *flaA* (*fleQ*) у *P. aeruginosa* и *Vibrio cholerae*, *flaK* и *flaM* у *V. parahaemolyticus* [33–36]. Для *S. maltophilia* механизмы, которыми с-di-GMP контролирует синтез и количество флагелл, остаются малоизученными, и лишь считанные работы посвящены фундаментальным аспектам их функционирования.

В 2014 г. J. Yang и соавт. установили, что регулирование экспрессии флагеллярных генов у *S. maltophilia* осуществляется гомологичным с *P. aeruginosa* мастер-регулятором FleQ (Smlt2295) [37]. Этот транскрипционный фактор (энхансер-связывающий белок), действующий в комплексе с предполагаемой АТФазой FleN, ингибируется, связываясь с с-di-GMP, что, в свою очередь, приводит к снижению экспрессии флагеллярных генов и способствует инициации формирования биоплёнок. В отсутствие с-di-GMP, т.е. в несвязанном состоянии, ситуация меняется на противоположную: FleQ способствует повышению экспрессии флагеллинов и, соответственно, снижает способность к «оседлому» образу жизнедеятельности в биоплёнках.

W. Liu и соавт. продемонстрировали наличие корреляции между повышенной экспрессией гена *bsmR* (регуляторного белка, фосфодиэстеразы с EAL-связывающим доменом) и увеличением подвижности, а также снижением способности к агрегации у штамма *S. maltophilia* CGMCC 1.1788 [38]. Таким образом, BsmR выступает в роли негатив-

ного регулятора образования биоплёнок. Оперон *bsmR* контролирует экспрессию по меньшей мере 349 генов, 34 из которых участвуют в синтезе флагеллинов под позитивной регуляцией транскрипционного фактора FsnR, который инициирует транскрипцию, связываясь с промотерными регионами двух оперонов: *smlt2303* и *smlt2318* [39, 40].

В 2022 г. X. Zhang и соавт. проанализировали гены, потенциально влияющие на уровень с-di-GMP у *S. maltophilia*, а именно кодирующие белки, содержащие домены GGDEF, EAL и HD-GYP [41]. Авторы обнаружили в геноме микроорганизма 33 гена с искомыми последовательностями и сконструировали мутантные штаммы с инактивированными генами. Из 33 мутантных штаммов 13 обладали пониженной подвижностью, что свидетельствовало о потенциальной роли соответствующих генов в её регуляции. Кроме того, в результате анализа дигуанилатциклаз и фосфодиэстераз авторы идентифицировали новую Fe²⁺-зависимую фосфодиэстеразу SisP, которая при повышении концентрации катионов железа прямо пропорционально увеличивала свою ферментативную активность, т.е. дозозависимо гидролизовала с-di-GMP.

Фимбрии типа I (SMF-1) играют роль адгезинов, обеспечивая закрепление *S. maltophilia* на эпителиальных клетках. В частности, было показано, что адгезия к биотическим и абиотическим поверхностям ингибируется в присутствии анти-SMF-1-антител [42]. Фимбрии также вовлечены в гемагглютинацию и формирование биоплёнок [42], а введение фимбрина мышам линии BALB/c стимулировало у последних выработку ИЛ-1β, ФНО-α и увеличение активности фагоцитов [43]. Важно отметить, что, в отличие от клинических изолятов, штаммы *S. maltophilia*, выделенные из окружающей среды, были лишены подобных фимбрий [44], что предполагает их значимую роль в адгезии/колонизации респираторного тракта у пациентов с муковисцидозом.

Производство фимбрий у *S. maltophilia* контролируется опероном *smlt0706–smlt0709* [45]. Несмотря на то что аминокислотные последовательности фимбрина у *S. maltophilia* схожи с последовательностями патогенных штаммов *E. coli*, N-терминальный регион белка SMF-1 у *S. maltophilia* значительно отличается от других бактериальных семейств (50–61% соответствия), что предполагает достаточно сильную филогенетическую удалённость данного вида [42].

Пили IV типа также играют важную роль при адгезии *S. maltophilia* к биотическим и абиотическим поверхностям, в том числе при формировании биоплёнок [46]. Невзирая на то что пили IV типа рассматриваются многими авторами как важный фактор вирулентности, значимых корреляций между вирулентностью и наличием семейства генов *pil*, ассоциированных с формированием пилей, у

S. maltophilia не обнаружено. Феномен формирования более массивных биоплёнок у штаммов с повышенной подвижностью был описан А. Pompilio и соавт., но данное явление наблюдали на малой выборке штаммов, выделенных из образцов мокроты больных муковисцидозом [5]. Из 9 изученных штаммов, не обладающих подвижностью, только 2 не образовывали биоплёнки. Авторы сделали заключение о том, что подвижность не является обязательным фактором, влияющим на способность образовывать биоплёнки. В то же время штаммы *S. maltophilia*, выделенные при других заболеваниях, обладали повышенной способностью формировать биоплёнки в сравнении с изолятами от больных муковисцидозом. Очевидно, здесь следует уточнить, что многие авторы под подвижностью подразумевают как «плавательную активность», так и «подёргивание» бактериальной клетки.

Системы секреции и экстрацеллюлярные энзимы

Клинические штаммы *S. maltophilia* продуцируют сидерофоры, протеазы (StmPr1-4), липазы (включая фосфолипазы С и D), нуклеазы, желатиназу, эластазу, фибролизин/стрептокиназу, эстеразы, гиалуронидазы, гемолизин и цитотоксины, которые выступают как факторы вирулентности и способствуют колонизации и персистенции микроорганизма, участвуя в адгезии, повреждении и уничтожении клеток хозяина, захвате ионов железа, необходимых для бактериального размножения [47, 48].

Основываясь на данных геномного секвенирования, из 9 известных бактериальных систем секреции у *S. maltophilia* обнаружены системы типов I, II, IV, V и VI [45, 49, 50]. Если для многих микроорганизмов роль систем секреции в формировании вирулентности хорошо известна, то для *S. maltophilia* она достаточно подробно описана только для систем II (Xps type II) и IV типов.

Клинический штамм *S. maltophilia* K279a обладает системой T2SS (гены *gsp* и *xps*), посредством которой секретируются по меньшей мере 7 белков, в число которых входят три сериновые протеазы StmPr1-3, которые вызывают цитотоксический эффект в эпителиальных клетках лёгких, деградацию фибронектина, фибриногена и ИЛ-8 [51, 52]. Известна и продуцируемая *S. maltophilia* протеаза StmPr4, но функциональная её роль пока не выяснена [53, 54].

S. maltophilia продуцирует 13 потенциальных антибактериальных белков-эффекторов. При этом кодирующие их нуклеотидные последовательности высоко консервативны для разных штаммов *S. maltophilia* [55]. Данные эффекторы вырабатываются системой секреции IV типа (T4SS), которая обнаружена как у штаммов, выделенных из природных источников, так и у клинических изолятов

S. maltophilia [56]. Эта система, называемая VirB/D4 T4SS, схожа с T4SS у бактерий наиболее близкого рода *Xanthomonas* и кодируется хромосомными генами *virB1-virB11* и *virD4*. Белки-эффекторы секретируются системой T4SS в окружающую среду или прямым контактным путем непосредственно в бактериальную клетку-конкурент, реализуя тем самым межвидовой антагонизм.

Межвидовой антагонизм, присущий *S. maltophilia*, изящно описали М.У. Nas и соавт. [56]. Авторы показали, что штаммы *S. maltophilia*, используя T4SS, вызывали гибель природного изолята *P. aeruginosa* 7700, штаммов *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* ПАК. Интересно, что *S. maltophilia* оказывает влияние и на некоторые другие виды рода *Pseudomonas*, но весьма избирательно. Например, *S. maltophilia* убивает *P. mendocina*, но не *P. fluorescens*, *P. putida* или *P. stutzeri*.

Заслуживает внимания факт выделения из упомянутых выше 13 антибактериальных эффекторов *S. maltophilia* двух потенциальных белков — RS14245 и RS14255, обладающих бактерицидными свойствами в отношении представителей родов *Pseudomonas* и *Escherichia*. Нейтрализованные при помощи блокирующих белков эффекторы RS14245 и RS14255 при добавлении в среду не приводили к гибели лабораторных и клинических штаммов *P. aeruginosa* и *E. coli*. Мутантные штаммы, лишённые этих белков или системы T4SS, обладали значительно сниженными бактерицидными свойствами [55].

Полученные данные интересны с различных точек зрения. С одной стороны, секреция эффекторов, подавляющих иные бактериальные виды, является значимым фактором, повышающим вирулентность *S. maltophilia*; с другой — выделение и изучение таких эффекторов потенциально может быть использовано для создания новых противомикробных препаратов для таргетной (адресной) терапии инфекций, вызванных псевдомонадами и эшерихиями.

Следует отметить, что система T4SS используется *S. maltophilia* не только для конкурентного межвидового ингибирования. Продукты данной системы выполняют и другие важные функции — ингибируют апоптоз в эпителиальных клетках хозяина и иницируют его в макрофагах [56].

Биоплёнки

При формировании биоплёнок первичная адгезия (слабое обратимое присоединение) планктонных форм *S. maltophilia* наступает уже в течение 30–60 мин. Вторая стадия развивается после 4 ч, при которой с участием полугибких фимбрий, филаментов флагелл и поверхностных ЛПС микроорганизм прочно закрепляется на поверхности. Закрепившиеся клетки начинают продуцировать экзополисахариды, формируя внеклеточный матрикс, а приблизительно через 10 ч образуют первые по-

верхностные микроколонии. Через 18–24 ч процесс переходит в третью стадию, на которой в созревающих биоплёнках происходит дифференциация клеток, образуются микроканалы для транспорта воды, солей, питательных веществ и обмена коммуникационными сигнальными молекулами (QS), о которых будет сказано ниже. На последней стадии созревшие биоплёнки порционно «отпочковывают» планктонные формы бактерий, которые за счёт присущей им подвижности начинают распространяться и колонизировать новые ниши [20].

В 2020 г. L. Ramos-Negazy и соавт., проанализировав созданную ими библиотеку мутантных транспозонов, идентифицировали ген *gpmA*, кодирующий фосфоглицератмутаза — гликолитический фермент, потенциально участвующий в начальных стадиях формирования биоплёнок как на полистироле, так и на линии человеческих эпителиальных клеток бронхов [57]. Штаммы *S. maltophilia* с нокаутированным геном *gpmA* в первые часы обладали существенно сниженной скоростью образования биоплёнок в сравнении со штаммом дикого типа. Интересно, что через 6 ч разница в скорости образования биоплёнок у штаммов дикого и мутантного типов полностью нивелировалась, что предполагает участие гена *gpmA* как медиатора на начальных этапах адгезии и образования биоплёнок [57, 58].

A. Pomilio и соавт. проанализировали 85 штаммов, выделенных как от больных муковисцидозом, так и при других инфекциях. Подавляющее большинство всех штаммов (88,2%) образовывали биоплёнки в тесте на планшетах. При этом штаммы, ассоциированные с муковисцидозом, демонстрировали меньшую оптическую плотность биоплёнок, но обладали большей множественной устойчивостью в сравнении с «немукковисцидозными» штаммами [59]. Вероятно, усиленное образование биоплёнок может служить защитным механизмом выживания именно для чувствительных микроорганизмов.

Анализ транскриптомных профилей клеток из биоплёнок (в сравнении с планктонными формами) показал, что лишь относительно малая доля генов вовлечена в переход к существованию в биоплёнках: уровень экспрессии снижается у 1–3% генов и увеличивается у 6–9% генов [60]. Тем не менее анализ имеющихся сведений о роли многочисленных факторов вирулентности приводит к заключению о том, что переход клеток от планктонного образа жизни к «оседлому» в биоплёнках инициируется множеством механизмов, которые требуют дальнейшего изучения.

Эффлюкс-помпы как факторы вирулентности

Как правило, эффлюкс-помпы принято рассматривать в числе механизмов, обеспечивающих ми-

кроорганизму устойчивость к противомикробным препаратам. Тем не менее функции некоторых типов эффлюкс-помп более широкие — они выходят за рамки, определённые термином «антибиотикорезистентность», и вовлечены в молекулярные механизмы формирования вирулентных свойств.

Эффлюкс-помпы вносят существенный вклад в природную устойчивость *S. maltophilia* к противомикробным препаратам. Обнаруженные у бактерии помпы различных типов выводят широкий спектр препаратов: фторхинолоны, тетрациклин и доксорубин под контролем SmrA-помпы; аминогликозиды, макролиды и полимиксины — посредством принадлежащей к этому же семейству ABC-помп (от ATP-binding cassette) MacABCsm [61].

Помпа EmrCABsm из суперсемейства транспортеров MFS (major facilitator superfamily) ответственна за вывод налидиксовой кислоты, эритромицина, карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразона и тетрахлорсалициланилида [62]. FusA (тип ABC) выводит фузариевую кислоту [63]. Кроме того, *S. maltophilia* имеет 8 типов помп RND-типа (Sme*), для 7 из которых (кроме SmeMN) их роль в формировании антибиотикорезистентности уже установлена. Кроме перечисленных выше противомикробных препаратов они также участвуют в транспорте сульфаметоксазола, хлорамфеникола, триметоприма и триметоприм-сульфаметоксазола [64].

Интересно отметить, что эффлюкс-помпы SmeYZ и MacABCsm, кроме известной (и считающейся в настоящее время основной) функции вывода ксенобиотиков из бактериальной клетки, оказывают влияние и на формирование флагелл, подвижность *S. maltophilia* и образование биоплёнок. При этом MacABCsm отличается от гомологичных помп других микроорганизмов. В частности, экспрессия её оперона конститутивна, имеет «врождённую» природу, и помпа обладает собственным оригинальным внешним мембранным белком MacCsm. Кроме того, в сравнении с гомологичной помпой MacAB-TolC из *E. coli*, она, как уже отмечалось, имеет расширенный спектр выводимых антибиотиков, включая макролиды, аминогликозиды и полимиксины [61].

Ещё одна заслуживающая внимания функция эффлюкс-помп была описана C.J. Wu и соавт., которые показали, что помпы SmeYZ, SmeDEF и SbiAB оказывают влияние на секрецию сидерофора стенобактина и утилизацию ионов железа [65].

Для некоторых микроорганизмов продемонстрирована роль эффлюкс-помп, в частности, их внешних мембранных структур — поринов — в увеличении инвазивных свойств бактерий [66] и защите последних от фагоцитоза [67], но для *S. maltophilia* такой информации не опубликовано.

Новые полученные данные свидетельствуют о том, что сложившееся у нас представление об основной функции эффлюкс-помп, сводящейся толь-

ко к выводу из клетки ксенобиотиков, не является абсолютной догмой и требует критического пересмотра и дальнейшего изучения.

Связь факторов вирулентности с доступностью железа

Железо является жизненно необходимым элементом для нормального метаболизма неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий, включая *S. maltophilia*. Конкуренция за железо между бактериями и организмом хозяина при хронических инфекциях может негативно влиять на организм хозяина. Захват железа бактериями может сопровождаться как местными повреждениями тканей, так и системными поражениями, например, выраженными анемиями. Поэтому системы, обеспечивающие захват и транспорт железа внутрь бактериальной клетки, рассматриваются как значимые факторы вирулентности [68].

У *S. maltophilia* обнаружены сидерофор- и гем-опосредованные системы транспорта в бактериальную клетку ионов железа. Опероном *entAFDBEC* кодируется синтез сидерофора энтеробактина, относящегося к классу катехоламинов, связывающего и переносящего Fe^{3+} в бактериальную клетку. Гем-опосредованная система находится под контролем оперонов *hgbBC* и, вероятно, *hmuRSTUV* [69].

Очень интересно, что система захвата железа не только сама является фактором вирулентности, но и может индуцировать активность других механизмов, ответственных за вирулентные свойства. Это происходит при дефиците железа в окружающей среде. Например, в лёгочной ткани при наличии в микроокружении железосвязывающих белков человека (трансферрин, лактоферрин), снижающих уровень свободного железа в среде, микроорганизм становится более вирулентным [70, 71]. В частности, при дефиците железа референс-штамм *S. maltophilia* K279a продуцировал повышенное количество экзополисахаридов, сигнальных молекул DSF и формировал более утолщённые и массивные биоплёнки [69, 71]. Установлено, что в регуляции такого метаболического изменения задействованы железообеспечивающая система *Fur* и транскрипционный регулятор σ -фактор, а от биодоступности железа потенциально зависит ответ микроорганизма на окислительный стресс и секреция экстрацеллюлярных энзимов [69, 71].

Система Quorum Sensing

Как большинство грамотрицательных бактерий, *S. maltophilia* (в частности, референс-штамм K279a) обладает QS-системой — уникальным сигнальным механизмом межклеточного бактериального обмена информацией [72]. Система отвечает за продукцию внеклеточных сигнальных молекул,

называемых аутоиндукторами, их детекцию и ответ (изменение экспрессии определённых генов) на появление сигнальных молекул в среде. Аутоиндукторы накапливаются в среде, и при достижении некоей пороговой концентрации окружающие бактериальные клетки способны их детектировать. Посредством такого обмена сигнальными молекулами клетки регулируют свои метаболические механизмы, отвечающие за колонизацию и вирулентность, включая изменение подвижности, образование биоплёнок, продукцию экстрацеллюлярных эффекторов и резистентные свойства [73, 74].

T.P. Huang и соавт. установили, что основной молекулой в QS-системе у *S. maltophilia* является аутоиндуктор DSF, представляющий собой *cis*- Δ^2 -11-метил-лауриновую кислоту — одноосновную насыщенную жирную кислоту, синтез которой регулируется генами *rpfF* и *rpfB* (от regulation of pathogenicity factors) [72]. За синтез собственного DSF и узнавание «чужих» сигнальных молекул ответственен генный кластер *rpf* — регулятор факторов вирулентности, для которого известны два варианта: *rpf1* и *rpf2*, делящие всю популяцию *S. maltophilia* на фено- и генотипически отличающиеся субпопуляции [74]. Кластер *rpf* кодирует синтез RpfF-синтазы и двукомпонентной системы RpfC/RpfG, отвечающих за детекцию и трансдукцию DSF. В активной форме RpfG-фосфодиэстераза гидролизует *c*-di-GMP до линейного GMP, таким образом регулируя экспрессию ряда генов вирулентности [75]. Здесь необходимо отметить, что только штаммы с вариантом гена *rpf-1* изначально способны продуцировать DSF в детектируемом количестве без внешнего стимула и, следовательно, контролировать образование биоплёнок, а также подвижность и вирулентность окружающих бактерий [74, 76]. У штаммов с *rpf-2* N-терминальный (сенсорный) конец RpfF-синтазы укорочен. Предполагается, что таким штаммам с редуцированным сенсорным доменом для выработки в среду собственных сигнальных молекул (DSF) требуется предварительная активация иэвне (например, под воздействием DSF от других бактерий или от штаммов *S. maltophilia* с системой *rpf-1*) [76].

Интересно отметить, что штаммы, несущие *rpf-2*-вариант гена (в частности, генотипы C), проявляли больший уровень устойчивости к численности и повышенную вирулентность в отношении личинок восковой моли *Galleria mellonella*, которые используются в качестве одной из моделей для оценки вирулентности. По всей видимости, это связано с повышенной способностью *rpf-2*-штаммов образовывать биоплёнки [77]. В то же время на другой модели определения вирулентности, в которой используются нематоды *Caenorhabditis elegans*, такой ассоциации не выявлено [77]. Генотипирование и идентификация варианта *rpf* являются полезными

и важными инструментами эпидемиологического мониторинга, при котором следует учесть, что штаммы *S. maltophilia* потенциально могут обмениваться кластерами *rpf* путём рекомбинации при горизонтальном переносе генов [76].

У *S. maltophilia* обнаружена двухкомпонентная сигнальная система трансдукции, названная BfmA–BfmK (Smlt4209–Smlt4208). Транскрипционный фактор BfmA, входящий в систему, связывается с промотерным регионом *bfmA–bfmK* и *Smlt0800 (acoT)* — геном, кодирующим ацил-коэнзим А-тиоэстеразу, которая ассоциирована с образованием биоплёнок [40].

В отличие от *P. aeruginosa*, у *S. maltophilia* не обнаружено полноценной канонической QS-системы LuxI/LuxR, основанной на сигнальных молекулах ацил-гомосерин лактонов. Тем не менее Р. Martínez и соавт., выполнив сравнительный анализ геномов, показали, что у *S. maltophilia* присутствует схожий с регулятором LuxR ген *smlt1839*, кодирующий регулятор SmoR (*Stenotrophomonas maltophilia* orphan regulator), который *in vitro* связывал синтетический лактон охo-C8-HSL, природный аналог которого синтезирует *P. aeruginosa*. Добавление же концентрированного супернатанта среды, на которой культивировалась *P. aeruginosa*, продуцирующая лактоны, стимулировало повышенную подвижность *S. maltophilia* на чашках Петри [78]. Другими словами, несмотря на отсутствие канонической системы LuxI/LuxR, собственные гомологичные системы межклеточного обмена позволяют *S. maltophilia* распознавать QS-сигнальные молекулы других видов с системой LuxI/LuxR. Гипотетически возможно, что эти системы связаны с T4SS и в определённых условиях могут инициировать секрецию эффекторов, нацеленных на ингибирование роста конкурентов (см. выше).

Рассматривая систему DSF у *S. maltophilia*, следует упомянуть феномен секреции через везикулы внешней мембраны [79]. Везикулы представляют собой малые наноструктуры, секретируемые бактериями, способные переносить нуклеиновые кислоты, белки и иные молекулы, например β-лактамазы. S. Devos и соавт. обнаружили, что в присутствии имипенема *S. maltophilia* секреция этих везикул резко увеличивается [80]. Интересен и состав обнаруженных переносимых в них молекул: это были кодируемые хромосомами два типа β-лактамаз, белки внешней мембраны и флагеллины Smlt0387 и Smlt0184. Эти флагеллины являются гомологами Ax21 — белка, влияющего на подвижность и образование биоплёнок у *Xanthomonas oryzae*. Функциональная роль этого белка для *S. maltophilia* пока не установлена, но предполагается, что его секреция инициируется DSF. Саму же систему секреции через везикулы относят к потенциальным факторам вирулентности на основе данных, что она

влияет на подвижность и образование биоплёнок *X. oryzae* [81].

Заключение

В последнее десятилетие изучению механизмов вирулентности *S. maltophilia* уделяется пристальное внимание. Природная множественная лекарственная устойчивость микроорганизма, его быстрая адаптация к неблагоприятным условиям окружающей среды и к новым нишам обитания, изящное переключение бактерией метаболических процессов — всё это вызывает немалый интерес как у специалистов, изучающих фундаментальные механизмы вирулентности, так и у клинических исследователей.

Обсуждая вирулентные свойства *S. maltophilia*, необходимо учитывать, что эта бактерия характеризуется выраженной внутривидовой вариабельностью: штаммы, выделенные в одном госпитале и даже от одного пациента, могут принадлежать к достаточно отдалённым филогенетическим группам и иметь разные фенотипы [4]. В качестве вероятных причин такой гетерогенности рассматривается быстрое накопление адаптивных мутаций, возникающих под влиянием селективного давления госпитальных условий или организма-хозяина, и горизонтальный перенос генов. Понимание молекулярных процессов, обеспечивающих быструю адаптацию и, соответственно, выживание микроорганизма в неблагоприятных условиях, позволит обнаружить потенциальные мишени для разработки новых антибактериальных препаратов, а также лучше понять межвидовые взаимодействия при полимикробных инфекциях и установить механизмы переключения метаболических путей при переходе оппортунистических патогенов от «природного» образа жизни к инфекционной интервенции.

В настоящем обзоре мы в кратком изложении представили актуальные данные, затрагивающие молекулярные аспекты факторов вирулентности *S. maltophilia*, для краткости не касаясь при этом механизмов антибиотикорезистентности. Надеемся, что обзорная статья будет интересна молекулярным биологам, клиническим микробиологам и биохимикам.

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 phosphoglucomutase 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 phosphoglucomutase 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 FlhS, 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, anokis, 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 cur-

- rent 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. Papenfort 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 (Smlt1839). *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 06.10.2023;
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 06.10.2023;
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 псевдотуберкулезной 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, антивирусных, 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.