

6

НОЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

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

Том 100
2023

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

6

NOVEMBER — DECEMBER

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.

6

НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ

**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 28.12.2023.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 15.

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
Миронов 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 микроби-
ологии 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 Voppegamage, 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 микроби-
ологии 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 эпидеми-
ологии 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 микроби-
ологии 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.

6

NOVEMBER–DECEMBER

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 December 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

- Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Садеева З.З., Новикова И.Е., Лазарева А.В., Карасева О.В., Фисенко А.П., Гинцбург А.Л.**
Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара* 399
- Афонина Н.М., Михеева И.В., Корабельникова М.И., Родионова З.С., Сницарь А.В., Переходов С.Н., Сметанина С.В., Тутельян А.В., Кузин С.Н., Акимкин В.Г.**
Результаты скрининга на антитела к вирусу ветряной оспы у медицинских работников многопрофильного стационара Москвы* 410
- Муртазалиев Х.Х., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Алиева Е.В., Ошаева А.В., Жамборова М.Х.**
Генетические маркеры возбудителей острых кишечных инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов в Чеченской Республике* 420
- Лебедева И.Б., Жданова С.Н., Кондратов И.Г., Сибиль К.В., Огарков О.Б., Брусина Е.Б.**
Генетическая структура и лекарственная устойчивость популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Кемеровской области — Кузбассе 428
- Ляшко А.В., Руднева И.А., Щербинин Д.Н., Ломакина Н.Ф., Трещалина А.А., Куприянова И.М., Гамбарян А.С., Тимофеева Е.Б., Шилов А.А., Садыкова Г.К., Прилипов А.Г., Тимофеев Б.И., Шмаров М.М., Рязанова Е.Л., Тимофеева Т.А.**
Потенциал адаптации к млекопитающим вирусам гриппа птиц H7N2 североамериканской линии* 442
- Рахматулина М.Р., Брико Н.И., Новоселова Е.Ю., Попухов П.Д.**
Рост заболеваемости сифилисом в Российской Федерации: иностранные граждане-мигранты как группа риска распространения заболевания 454
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П., Носков А.К.**
Молекулярно-генетический мониторинг возбудителей холеры 462
- Рубис Л.В., Чевская В.Е., Екимова О.В., Сафонова О.С.**
Оценка регистрируемого и скрытого эпидемического процесса клещевого энцефалита в Республике Карелия 472
- Царева Т.В., Янушевич О.О., Царев В.Н., Балмасова И.П.**
Бактерии рода *Filifactor* у больных пародонтитом и сахарным диабетом по данным метагеномного анализа микробиома пародонта* 485
- ОБЗОРЫ**
- Нагорных А.М., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Акимкин В.Г.**
Накопленный опыт и перспективы исследования вируса гепатита В *in vivo** 495
- ХРОНИКА**
- Итоги X Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» 511

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Lazareva A.V., Karaseva O.V., Fisenko A.P., Gintsburg A.L. Genomic features of resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> , isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid of pediatric hospital patients*	399
Afonina N.M., Mikheeva I.V., Korabelnikova M.I., Rodionova Z.S., Snitsar A.V., Perekhodov S.N., Smetanina S.V., Tutelyan A.V., Kuzin S.N., Akimkin V.G. Results of screening for antibodies to varicella-zoster virus in healthcare workers of a multidisciplinary hospital in Moscow*	410
Murtazaliev Kh.Kh., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Alieva E.V., Oshaeva A.V., Zhamborova M.Kh. Molecular markers of acute intestinal infections in HIV-infected patients in the Chechen Republic*	420
Lebedeva I.B., Zhdanova S.N., Kondratov I.G., Sybil K.V., Ogarkov O.B., Brusina E.B. Genetic structure and drug resistance of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains in the Kemerovo Region — Kuzbass.....	428
Lyashko A.V., Rudneva I.A., Shcherbinin D.N., Lomakina N.F., Treshchalina A.A., Kupriyanova I.M., Gambaryan A.S., Timofeeva E.B., Shilov A.A., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Timofeev B.I., Shmarov M.M., Ryazanova E.L., Timofeeva T.A. The adaptive potential of North American subtype H7N2 avian influenza viruses to mammals*	442
Rakhmatulina M.R., Briko N.I., Novoselova E.Yu., Lopukhov P.D. The increase in the incidence of syphilis in the Russian Federation: foreign migrant citizens as a risk group for the spread of the disease	454
Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Pisanov R.V., Oleinikov I.P., Noskov A.K. Development of a methodology for molecular genetic monitoring for the cholera causative agent	462
Rubis L.V., Chevskaya V.E., Ekimova O.V., Safonova O.S. Assessment of registered and hidden epidemic process of tick-borne encephalitis in the Republic of Karelia.....	472
Tsareva T.V., Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Balmasova I.P. Bacteria of genus <i>Filifactor</i> in patients with periodontitis and type 2 diabetes in accordance with metagenomic analysis of the periodontal microbiome*	485
REVIEWS	
Nagornykh A.M., Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Akimkin V.G. Accumulated experience and future prospects of <i>in vivo</i> hepatitis B virus research*	495
CHRONICLE	
Results of the X Russian Scientific Conference with the participation of MSM “Persistence and symbiosis of events”.....	511

ORIGINAL ARTICLES

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-430>



Genomic features of resistant *Klebsiella pneumoniae*, isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid of pediatric hospital patients

Olga L. Voronina¹✉, Marina S. Kunda¹, Natalia N. Ryzhova¹, Ekaterina I. Aksenova¹, Zulfirya Z. Sadeeva², Irina E. Novikova², Anna V. Lazareva², Olga V. Karaseva^{2,3}, Andrey P. Fisenko², Alexander L. Gintsburg¹

¹N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

²National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

³Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CP-Kp), which are international high-risk clones, have become a problem of utmost importance. CP-Kps, adapting to the hospital environment, evolve into convergent pathotypes. Such variants combine traits of two genetic lineages: multidrug resistant (MDR) and hypervirulent. The pathotypes, along with MDR *K. pneumoniae*, pose an exceptional threat to young patients during systemic infection.

The **objective** of this study is the detailed molecular genetic analysis of MDR isolates of *K. pneumoniae* detected during the monitoring of resistant Gram-negative bacteria at the National Medical Research Center for Children's Health in 2014–2021.

Materials and methods. Whole-genome sequencing with a subsequent bioinformatics analysis of eight MDR isolates from the bloodstream and cerebrospinal fluid.

Results. MDR isolates belonged to 4 sublineages (SL): SL307, SL395, SL29 and SL1198. In the genomes of 6 pangrug-resistant (PDR) isolates, genes associated with resistance to all categories of antibiotics recommended for Enterobacteriaceae therapy were identified. Plasmids were present in all genomes. In 6 isolates, plasmids contained heavy metal ion resistance operons in addition to antibiotic resistance genes. Prophages within the plasmids were also involved in the transfer of resistance genes. The ST395 isolate from the cerebrospinal fluid belonged to the convergent pathotype in terms of resistance and virulence. Comparison of genomes within SLs revealed recombination events in the K- and O-locus regions and the Yersiniabactin operon.

Conclusion. Thus, in a sample of resistant *K. pneumoniae* isolated from bloodstream and cerebrospinal fluid, 6 PDR isolates were detected, one of which belongs to the convergent pathotype ST395.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, whole genome sequencing, carbapenem resistance, extended-spectrum beta-lactamases, multidrug resistance, virulence, plasmids, prophages

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

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

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

For citation: Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Lazareva A.V., Karaseva O.V., Fisenko A.P., Gintsburg A.L. Genomic features of resistant *Klebsiella pneumoniae*, isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid of pediatric hospital patients. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):399–409.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-430>

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

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-430>

Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара

Воронина О.Л.^{1✉}, Кунда М.С.¹, Рыжова Н.Н.¹, Аксенова Е.И.¹, Садеева З.З.², Новикова И.Е.², Лазарева А.В.², Карасева О.В.^{2,3}, Фисенко А.П.², Гинцбург А.Л.¹

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

²Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия;

³Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы и относящиеся к международным клонам особого риска, адаптируясь к условиям стационара, эволюционируют в конвергентные патотипы. Такие варианты сочетают признаки двух генетических линий: множественно резистентной (MDR) и гипервирулентной. Патотипы, наряду с MDR *K. pneumoniae*, при системной инфекции представляют особую угрозу для пациентов раннего возраста.

Цель исследования — подробный молекулярно-генетический анализ MDR-изолятов *K. pneumoniae*, выявленных при мониторинге резистентных грамотрицательных бактерий в НМИЦ здоровья детей в 2014–2021 гг.

Материалы и методы. Проведено полногеномное секвенирование с последующим биоинформационным анализом 8 MDR-изолятов из крови и ликвора.

Результаты. MDR-изоляты относились к 4 сублиниям (SL): SL307, SL395, SL29 и SL1198. В геномах 6 пан-резистентных (PDR) изолятов выявили гены устойчивости ко всем категориям антибиотиков, рекомендованных для терапии *Enterobacteriaceae*. Плазмиды, присутствовавшие во всех геномах, помимо генов антибиотикорезистентности, в 6 изолятах содержали опероны устойчивости к ионам тяжёлых металлов. В переносе генов резистентности участвовали также профаги в составе плазмид. Изолят ST395 из ликвора по показателям резистентности и вирулентности относился к конвергентному патотипу. Сопоставление геномов внутри SLs выявило рекомбинационные события в областях K- и O-локусов и оперона иерсиниябактина.

Заключение. В выборке резистентных изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из кровотока и ликвора, обнаружили 6 изолятов PDR, один из которых относится к конвергентному патотипу ST395.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, полногеномное секвенирование, устойчивость к карбапенемам, бета-лактамазы расширенного спектра действия, множественная устойчивость к антибиотикам, вирулентность, плазмиды, профаги

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и Государственного задания НМИЦ здоровья детей.

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

Для цитирования: Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Садеева З.З., Новикова И.Е., Лазарева А.В., Карасева О.В., Фисенко А.П., Гинцбург А.Л. Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):399–409.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-430>

EDN: <https://www.elibrary.ru/y1xbdz>

Introduction

Klebsiella pneumoniae occupies the leading position among the *Enterobacteriaceae* causing nosocomial infections in Russia [1]. A concerning problem is the growing proportion of carbapenem-resistant (carbapenemase-producing, CP-Kp) *K. pneumoniae* and the identification of isolates with carbapenemase genes of different classes (A, B, D) simultaneously present in their genomes [1]. According to the data of 2020, CP-Kp in Russia belonged to clonal groups (CG) CG395, CG11, CG147, and CG307 [1], which are classified as international high-risk clones. CP-Kp ST395 prevail in bloodstream infections in patients with hematologic malignancies (37.7%) [2], neurosurgery ICU patients (27.1%) [3], causing severe systemic infections [4]. During the years 2013 to 2018, the AMRmap — national antibiotic resistance monitoring system (<https://AMRmap.ru>) — identified 108 CP-Kp ST395 isolates included in an international genomic study that showed the emergence of a convergent pathotype in CG395, combining markers of resistance and hypervirulence [5]. Convergence of traits of two genetic lineages of *K. pneumoniae*, being multidrug resistant (MDR) and hypervirulent (hvKp), was first reported by Gu et al. for isolate ST11 [6]. Starkova et al. studied convergent (CP- hvKp) *K. pneumoniae* isolates ST15, ST147, ST395, ST874, identified in clinics of St. Petersburg, and showed the presence of hybrid plasmids carrying virulence genes and NDM β -lactamase within them [7]. Along with plasmids, other mobile genetic elements such as phages, integrons and transposons contribute to the evolution of bacterial genomes [8]. Conjugative transposons (integrative conjugative elements, ICE) play a specific role in horizontal gene transfer in *K. pneumoniae* [9]. Such a high rate of adaptation and evolution of *K. pneumoniae* in hospital settings poses a particular threat to young patients in need of surgical intervention. Bloodstream infections in such patients lead to unfavorable clinical prognosis [10]. The objective of our study was to analyze MDR *K. pneumoniae* isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid of patients at the National Medical Research Center (NMRC) for Children’s Health in 2014–2021.

Materials and methods

Materials

8 cultures of *K. pneumoniae* (Table 1) isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid at the NMRC for Children's Health and the Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology during monitoring of drug resistance of nosocomial isolates of *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* (KAP) in 2014-2021. The study was carried out with the voluntary informed consent of patients and their legal representatives, the study protocol was approved by the Local Ethics Committee

Table 1. Characteristics of antibiotic-resistant *K. pneumoniae* isolates

Patient	Isolate	Data of isolation	Accession number	Genotype	Sublineage	Clonal group (CG)	wzi allele	Associated KL type	O locus	O type	Virulence score	Resistance scores
P9	SCCH70:Kpn76815	19.06.2017	JAUPHS000000000	ST307	SL307	CG307	–	KL102*	O1/O2v2	O2afg	1	3
P11	SCCH72:Kpn881723	20.09.2018	JAUPHU000000000	ST2975	SL307	CG307	173	KL102	OL102	OL102	1	3
P8	SCCH69:Kpn69138	13.04.2016	JAUOCC000000000	ST395	SL395	CG395	2	KL2	O1/O2v2	O2afg	4	3
P18	SCCH87:Kpn2182174	05.11.2021	CP122350-CP122355	ST395	SL395	CG395	2	KL2	O1/O2v1	O1	1	3
P17	SCCH84:Kpn2082401	12.09.2020	JAUTIO000000000	ST866	SL1198	CG1198	478	KL46	O3b	O3b	1	3
P17	SCCH86:Kpn207262	02.10.2020	JAUTIQ000000000	ST866	SL1198	CG1198	478	KL46	O3b	O3b	1	3
P10	SCCH71:Kpn863165	17.12.2018	JAUPHT000000000	ST985	SL29	CG985	39	KL39	O1/O2v2	O1	1	3
P12	SCCH73:Kpn96857	11.03.2019	JAUPHV000000000	ST29	SL29	CG29	19	KL19	O1/O2v2	O1	1	3

of the NMRC for Children's Health (protocol No. 5a dated 02.06.2022). The cultures were characterized by phenotypic multidrug resistance (MDR), extensive drug resistance (XDR) or pandrug Resistance (PDR) in relation to the antibiotic categories recommended by EUCAST for Enterobacteriaceae [11,12], and according to the EUCAST criteria [11].

Methods

Cultivation of *K. pneumoniae* was carried out on blood and Uri-select agar (BioRad) at 37°C for 24-48 hours. MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) was used for identification.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by microdilution for the following categories of antimicrobials:

- 1) Aminoglycosides: gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin;
- 2) Carbapenems: imipenem, meropenem;
- 3) Extended-spectrum (3rd and 4th generation) cephalosporins: cephalosporin, cefepime;
- 4) Fluoroquinolones: ciprofloxacin, levofloxacin;
- 5) Folate metabolism inhibitors: trimethoprim/sulfamethoxazole;
- 6) Monobactams: aztreonam;
- 7) Phosphonic acids: fosfomicin;
- 8) Polymyxins: colistin (polymyxin E), polymyxin B;
- 9) Penicillins with beta-lactamase inhibitors: ticarcillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam.

To identify resistance mechanisms and analyze virulence factors, 8 isolates were examined by whole-genome sequencing.

DNA was extracted from isolates using a method described elsewhere [13], supplemented by purification from polysaccharides using CTAB (cetyltrimethylammonium bromide).

DNA libraries were prepared according to the protocol of Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina) and sequenced on a NextSeq 500/550 instrument (Illumina) using a "Mid Output 300 cycles" cartridge.

CLC Genomic Workbench v.21.0.1 (Qiagen) and SPAdes v3.13.0¹ were used for genome assembly. CGView Server was used to visualize the results of replicon assembly and genome comparisons² [14]. Annotation was performed using Rapid Annotations Subsystems Technology [15] and NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [16]. PHASTER was used to search for prophage areas³ [17]. Results of full-genome sequencing were deposited in GenBank in bioproject PRJNA561493 under the numbers shown in Table 1.

Genomic data were analyzed using the resources of the platform Pathogenwatch v. 21.0.0⁴, which allows interaction with Kleborate v. 2.2.0⁵ [18], a resource specifically designed for *K. pneumoniae* complex research. Kleborate v. 2.2.0 was used to determine genotype in the context of MLST (MultiLocus Sequence Typing) genes, virulence factors: yersiniabactin (*ybt*), aerobactin (*iuc*), colibactin (*clb*), salmohelin (*iro*), hypermucoidity (*rmpA*, *rmpA2*), as well as antimicrobial resistance determinants. With reference to the Kaptive site⁶ [19] alleles of the *wzi* gene were determined, and K loci (capsule) and O loci (lipopolysaccharide) were typed.

The criteria developed by Kleborate v. 2.2.0 were used to assess the level of virulence and resistance.

For virulence:

- level 5 — *ybt*, *iuc*, *clb*;
- level 4 — *ybt*, *iuc*;
- level 3 — *iuc*;
- level 2 — *ybt*, *clb* (or only *clb*);
- level 1 — *ybt*;
- level 0 — complete absence.

For resistance:

- level 3 — carbapenemases and colistin resistance;
- level 2 — carbapenemases;
- level 1 — extended-spectrum β -lactamases without carbapenemases;
- level 0 — absence of extended-spectrum β -lactamases [18].

The VFDB⁷ database was used to analyze the extended spectrum of virulence factors [20]. The web platform BIGSdb-Pasteur⁸ was accessed to clarify genotypes for *ybt*, *iuc*, *clb*, as well as for the identification of heavy metal ion resistance loci.

A more complete spectrum of resistance genes was determined using the CARD resource⁹ [21], as well as the BV-BRC¹⁰, formed on the basis of PATRIC [22].

PlasmidFinder 2.1¹¹ [23] was used to identify incompatibility groups (Inc) of plasmid replicons.

Results

685 cultures were isolated from bloodstream and cerebrospinal fluid during monitoring of drug resistance of nosocomial isolates of *K. pneumoniae*, *Acineto-*

¹ St. Petersburg genome assembler, Russia, URL: <http://cab.spbu.ru/software/spades/>

² CGView Server.

URL: http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/

³ PHAge Search Tool Enhanced Release. URL: <https://phaster.ca/>

⁴ Pathogenwatch v. 21.0.0.

URL: <https://pathogen.watch/>

⁵ Kleborate v. 2.2.0.

URL: <https://github.com/klebgenomics/Kleborate/wiki>

⁶ Kaptive. URL: <https://kaptive-web.erc.monash.edu/>

⁷ Virulence factor database. URL: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>

⁸ Institut Pasteur Klebsiella pneumoniae species complex.

URL: <https://bigfdb.pasteur.fr/klebsiella/>

⁹ Comprehensive Antibiotic Resistance Database.

URL: <https://card.mcmaster.ca/>

¹⁰ Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center.

URL: <https://www.bv-brc.org/>

¹¹ PlasmidFinder 2.1.

URL: <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>

bacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* (KAP) in two multidisciplinary children's hospitals: NMRC for Children's Health and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology, in 2014-2021, including 63 (9.2%) isolates of *K. pneumoniae*. Eight isolates presented in Table 1 were resistant to multiple categories of antibiotics. Isolates from patients P8-P12 and P18 were PDR according to MIC data for all 9 antibiotic categories. Two *K. pneumoniae* isolated 3 weeks apart from patient P17 were examined. Both isolates were sensitive to fluoroquinolones (to levofloxacin at increased exposure) (Table 2). The first isolate by time of isolation was also sensitive to folate metabolism inhibitors and even showed an MIC against polymyxin B corresponding to a borderline resistance value. Thus, the former isolate can be recognized as MDR and the latter as XDR.

Out of the 8 isolates, 7 were isolated from the bloodstream and 1 (P8) was isolated from cerebrospinal fluid. Patients, with the exception of P12 (8 years old), were under 1 year of age, predominantly had genetically determined diseases resulting in malformations requiring surgical intervention. P8 had severe combined trauma, P12 had systemic vasculitis accompanied by hemolytic-uremic syndrome. Fatal outcome was recorded in 2 cases (P10 and P12).

The main characteristics of resistant isolates. All 8 isolates belonged to phylogroup Kp1 and were subdivided into 4 sublineages (SL) (Table 1), 2 of which (307 and 395) are among the most represented in nosocomial *K. pneumoniae* in Russia [1]. Three sublineages included one CG each. SL29 was represented by 2 CGs. Despite the fact that ST985 differs by one locus (*gapA*) allele profile from ST29 (single locus variant, SLV), it belongs to another clonal group — CG985. It is important to note that in CG307, ST2975 is also the SLV of ST307 at the *rpoB* locus.

The SL29 isolates had the same O-antigen variant of O1/O2v2. The same variant was characteristic of the ST307 and ST395 P8 isolates. Another ST395 isolate (P18) had an O-antigen of O1/O2v1. The different variants of the O-antigen are determined by the mono-

mer constituting the polysaccharide. Variant 1 contains d-galactan I and variant 2 contains d-galactan III [24]. Thus, even the isolate genomes of the same genotype may differ in the structure of the operon responsible for the O-antigen. P17 isolates have their own variant, O3b, but similar to the O1/O2 variants, it is prevalent in isolates causing human diseases [24]. Isolate ST2975 has a new O-antigen, therefore it is named OL102 after the capsular antigen number.

In contrast, capsular polysaccharides are distinct in SL29 isolates but identical in ST395 isolates. SL307 isolates have a new KL-type, KL102. Furthermore, while the capsular operon in isolate ST2975 is fully represented, the ST307 genome contains only the full-length *cpsACP* among the genes at the 5'-end of the operon (*galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*). The *galF* gene is a pseudogene, and 4 other genes, as well as the following *wbaP*, are missing. The *wbaP* gene encodes a glycosyltransferase that initiates capsular polysaccharide synthesis by transferring galactose-1-phosphate to the acceptor udeprenyl-phosphate. In the absence of this enzyme, capsule synthesis is not possible [25]. The *wzi* and *wza* genes are responsible for outer membrane channel proteins, while the *wzc* and *wzb* genes are regulators of polymerization and transport of capsular polysaccharides to the surface of the bacterial cell.

The fimbriae operons *fimA–fimK* (type 1) and *mrkA–mrkJ* (type 3), as well as the type IV *pilW* pilus gene were present in the genomes of all isolates.

In order to determine the resistance and virulence of the selected isolates based on genomic data, we used the quantitative assessments offered by Kleborate v. 2.2.0 [19] (Table 1). The genomes of all isolates contained the *ybt* operon, which is located in *ICEKp*: *ICEKp4* (*ybt10*) in CG307 isolates, *ICEKp5* (*ybt14*) in ST395 P8 and ST29 isolates, *ICEKp12* (*ybt16*) in ST395 P18 and ST985 isolates, and *ICEKp15* (*ybt18*) in ST866 isolates.

Most of the isolates had a virulence level of 1. The ST395 P8 isolate had a level of 4, the highest, because in addition to *ybt*, the isolate's genome encodes aerobactin (AbST95). Of the additional virulence genes,

Table 2. Comparison of antibiograms of *K. pneumoniae* ST866 isolates from patient P17 in three categories of antibiotics

Isolate	MIC, mg/L			
	fluoroquinolones		folate pathway inhibitors	polymyxins
	ciprofloxacin	levofloxacin	trimethoprim/sulfamethoxazole	Polymixin B
SCCH84:Kpn2082401	≤ 0,25	1*	2	2
SCCH86:Kpn207262	0,5*	1*	16/304	16
Resistance — MIC breakpoints, mg/L	0,5	1	4	2

Note. *The sensitivity at increased exposure; the cells corresponding to the sensitivity of the isolate to the antimicrobial drug are highlighted in grey.

peg-344 [26], responsible for drug and metabolite transporter permease, is present only in the ST395 P8 genome. The hypermucoidity genes *rmpA* and *rmpA2* were not detected in this group of isolates.

The resistance level is the highest in all isolates (3), because both carbapenemase genes and mutations in genes (*PhoP_26Q*) providing resistance to colistin (polymyxin E) are present in the genomes [27].

The spectrum of **β -lactamase genes** in the genomes of isolates is extensive (**Fig. 1**). All genomes contain at least one carbapenemase: OXA-48 (class D) or NDM-1 (class B, metallo- β -lactamase), and the ST2975 and ST395 P18 genomes contain both β -lactamases. NDM-1 is also classified as an extended-spectrum β -lactamase [28], to which CTX-M-15 and CTX-M-3 (class A) also belong. Only the ST395 P18 isolate did not contain CTX-M lactamase. As far as the other class A β -lactamases is concerned, the TEM and SHV lactamases are present in all genomes. The CMY-6 cephalosporinase (class C) is present in most genomes; it is absent only in the ST307 and ST395 P8 genomes. However, these genomes have an additional class D β -lactamase, OXA-1, which is also present in the ST985 genome. The ST29 genome is distinguished by the presence of two additional class D β -lactamases, OXA-10 and OXA-244. Thus, the isolate genomes contain at least 5 genes of β -lactamases of different classes, while there are 7 genes in the ST29 genome.

Resistance genes to other antibiotic categories are shown in **Fig. 2**. A minimum of 6 additional resistance genes were detected in ST866 isolates. Among them there are no resistance genes to fluoroquinolones and trimethoprim, which confirms the phenotypic data. The maximum number of additional genes in isolate ST395 P8 is 16. Along with isolate ST985 (14 genes), they have at least one resistance-determining gene for each category of antibiotics. It is important to note that only the leading isolates have macrolide resistance genes.

Heavy metal ion resistance genes were found in 6 out of 8 genomes (**Fig. 3**). These are resistance operons to arsenic (*arsABCDR*), copper (*pcoABCDERS*), silver (*silABCEFGPRS*), and tellurium (*terABCDEWXYZ*). All 4 operons are present in the ST307 genome, 3 each in the ST2975 and ST985 genomes, 2 each in ST866, with only the tellurium resistance operon being present in the ST395 P8 genome.

Plasmids of resistant isolates. Typically, heavy metal operons and many resistance genes are present in plasmids [29]. We estimated the number of Inc plasmid groups for the genomic data of each isolate (**Fig. 4**). The maximum number of Inc was found in isolate ST307 (7) and the minimum in isolates ST985 (1) and ST866 (3). The data confirm the presence of plasmids in the genomes of all isolates.

The different spectrum of Inc in isolates of the same ST395 genotype attracts attention. Assembly of

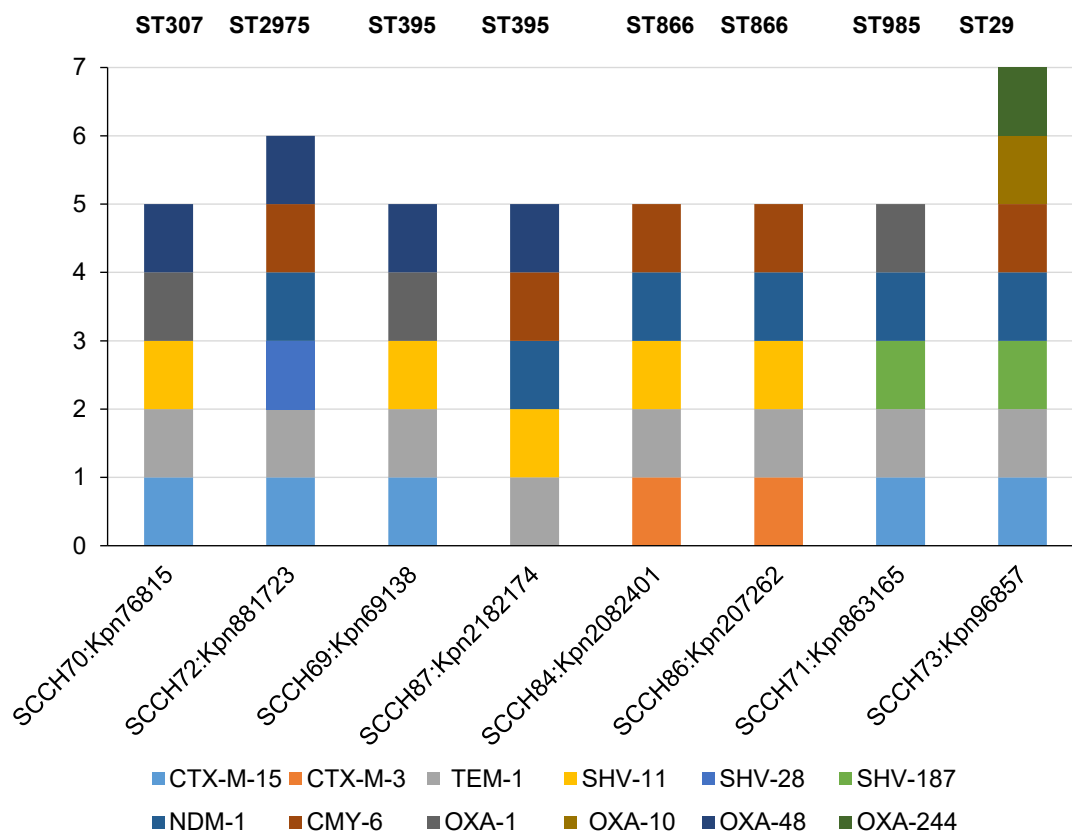


Fig. 1. Diversity of beta-lactamase genes in the genomes of the studied isolates.

plasmid replicons of ST395 P8 and ST395 P18 isolates showed that the ST395 P18 genome contains 5 plasmids, 3 of which are capable of conjugative transfer, and the ST395 P8 genome contains 4 plasmids, one of

which is cryptic (2 are capable of conjugative transfer). The plasmidome of the isolates differed in the number and set of resistance and virulence genes (Fig. 5). The plasmidome of ST395 P8 was characterized by

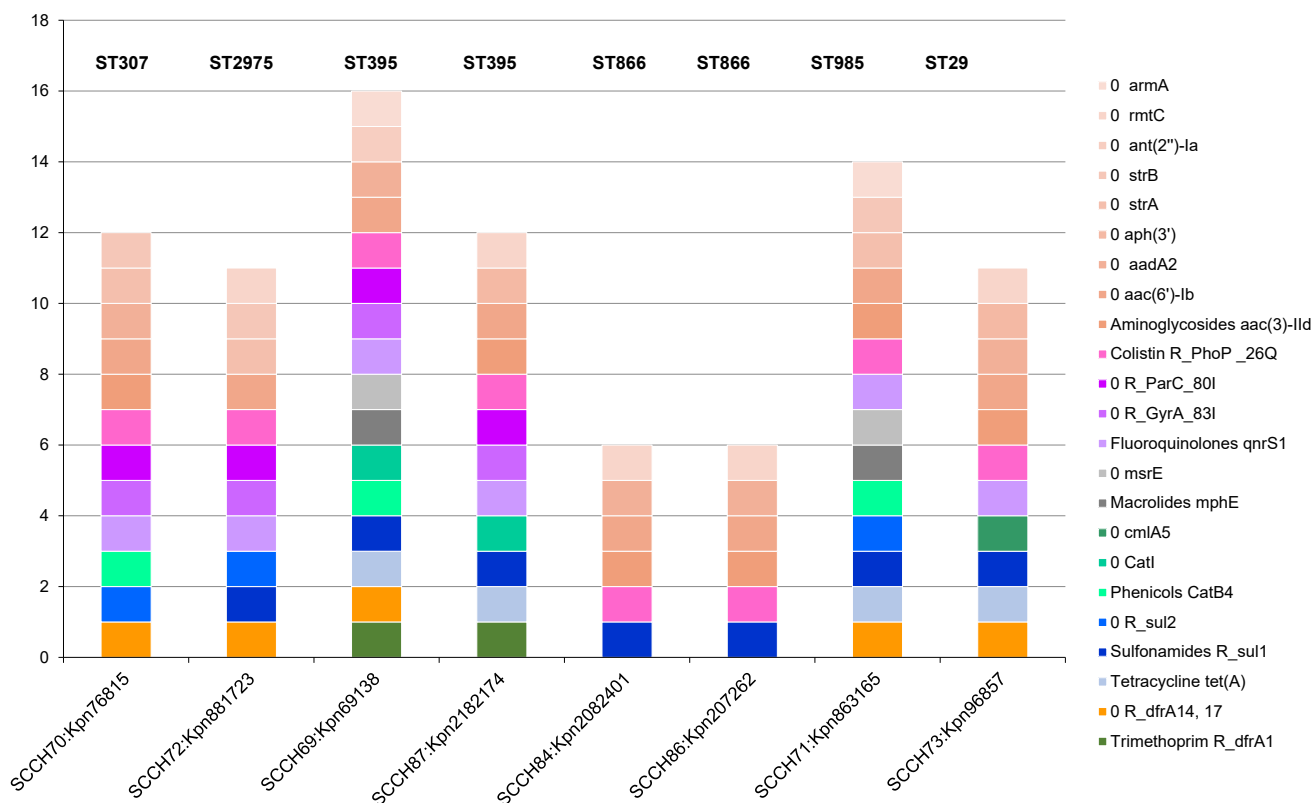


Fig. 2. Diversity of resistance genes to other categories of antibiotics in the genomes of the studied isolates.

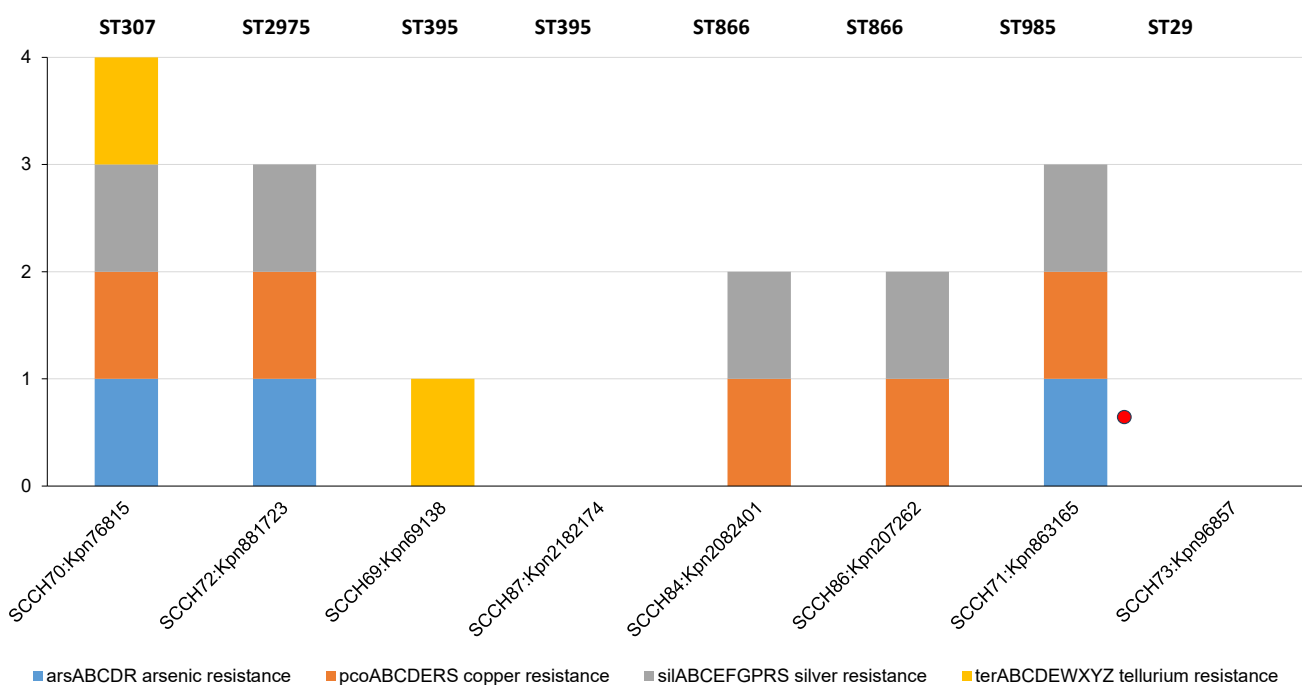


Fig. 3. Genes of resistance to heavy metal ions in the genomes of the studied isolates.

The red dot marks the incomplete *arsBCRD* operon.

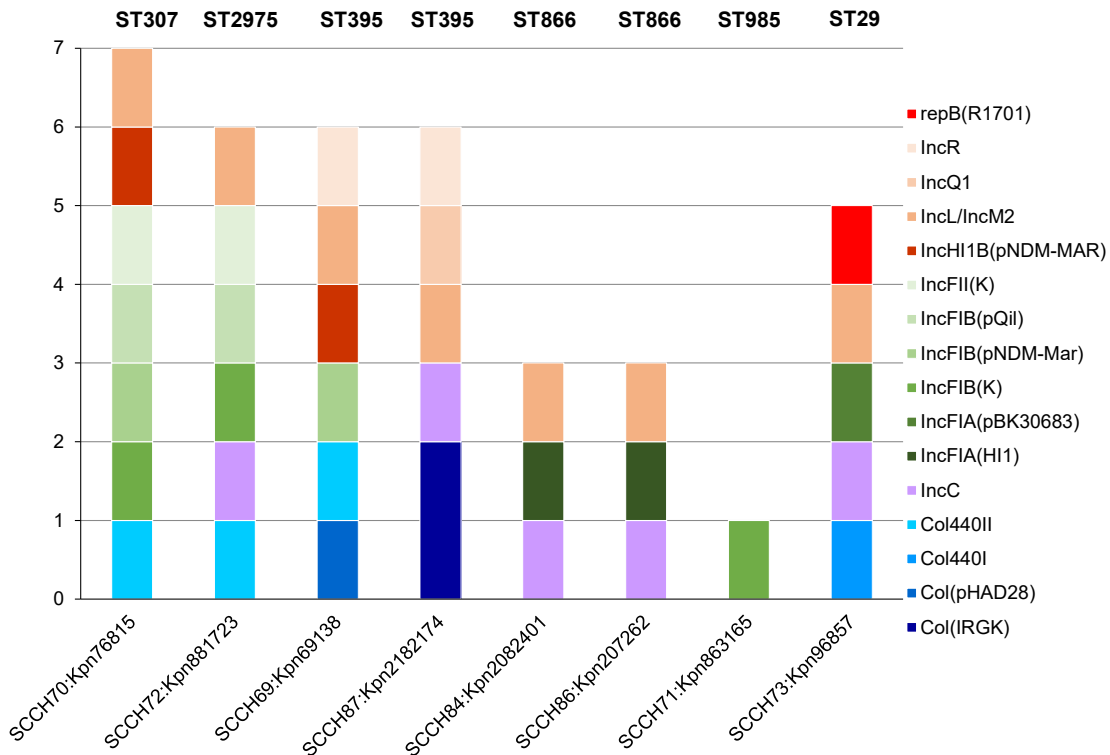


Fig. 4. Diversity of origins of replication (Inc) plasmids in the studied isolates.

the presence of extended spectrum β -lactamase genes, aerobactin, *peg-344*, tellurium resistance operon, and a greater number of β -lactamase genes. The plasmidome of ST395 P18 had more carbapenemase genes, sulfonamide and aminoglycoside resistance genes. Thus, the

plasmidome of ST395 isolates underwent significant changes from 2016 to 2021.

Comparison of the prophages of ST395 isolates showed differences in these mobile genetic elements as well. Eight prophages were identified in the ST395

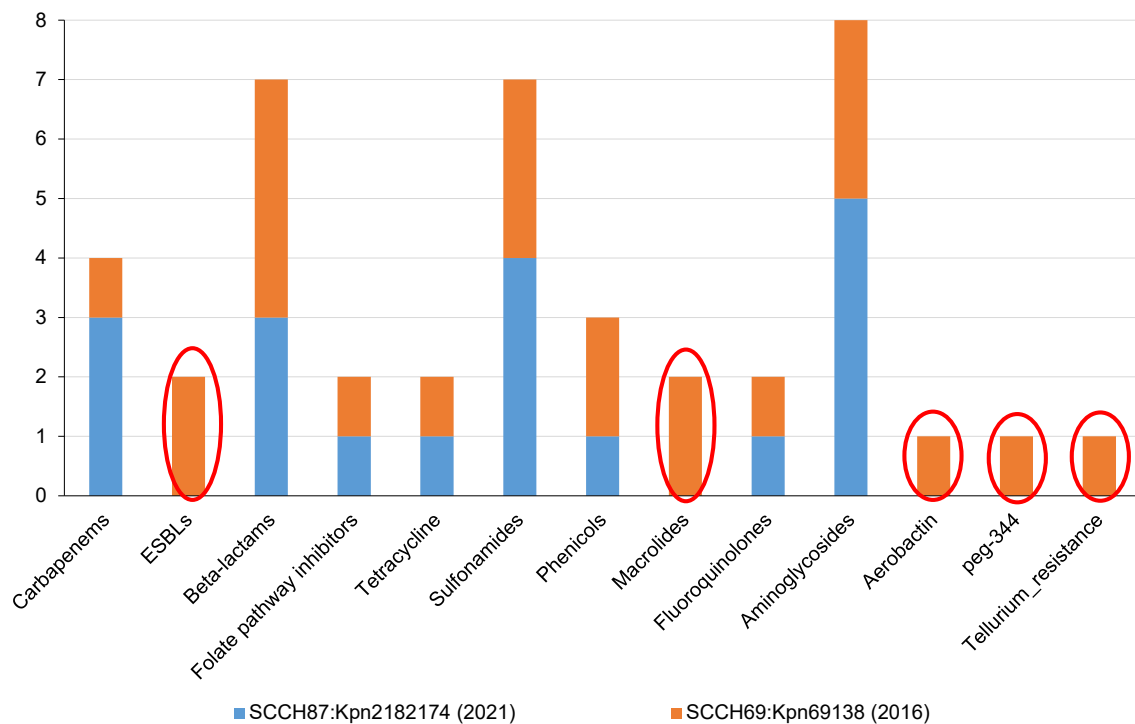


Fig. 5. Resistance and virulence genes in *K. pneumoniae* ST395 plasmids. Circled are factors that are present only in the plasmids of the ST395 P8 isolate.

P8 genome, 7 in the ST395 P18 genome; 5 prophages were common to the ST395 genomes. However, ST395 P8 plasmids contained twice as many prophages (10) compared to ST395 P18 plasmids (5). All prophages had homology with 17 different bacterial phages of the *Caudoviricetes* class. The chromosome prophages each contained 3 holin genes that form pores in the cell membrane [30], and lysin genes that damage peptidoglycan: 4 lysozyme genes, ST395 P8, and 5 lysozyme genes and a membrane-bound lytic transglycosylase D gene, ST395 P18. CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) systems were absent in both genomes. At the same time, the analysis of prophage plasmids of ST395 isolates confirmed the observation that phages could possibly be carriers of antibiotic resistance genes [31]. The prophages of plasmids of ST395 P8 isolate contained genes of β -lactamases (5), chloramphenicol acetyltransferases (3), aminoglycoside acetyltransferases (2), dihydrofolate reductase, streptomycin adenylyltransferase, and tellurium resistance operon. The plasmid prophages of isolate ST395 P18, which contained genes for aminoglycoside acetyltransferases (3), dihydropteroate synthases (2), β -lactamases TEM and OXA-48, chloramphenicol acetyltransferase and 3 SMR (Small multidrug resistance) efflux transporters, were not inferior to them either.

Discussion

The study revealed a great diversity of MDR *K. pneumoniae* genotypes isolated from cerebrospinal fluid and bloodstream. According to the data of the Pasteur Institute¹², ST307 is the most prevalent worldwide (1786 isolates, 21 in Russia), followed by ST395 (380, 188 in Russia) and ST29 (255, 2 in Russia), ST985 (48), ST2975 (29, 12 in Russia), and ST866 (7). Infection with PDR *K. pneumoniae* ST29 and ST985 resulted in fatal outcomes. The systemic infection was detected in other loci besides the bloodstream in both patients P10, P12 and patients P9, P11, P17, P18. The infection in Patient P8 was detected only in the cerebrospinal fluid and was caused by the most virulent ST395 isolate (level 4). In terms of resistance (PDR) and virulence, the ST395

P8 isolate matched the characteristics of the convergent ST395 pathotype [5]. The study of the isolate plasmids confirms the transfer of resistance factors (including to heavy metal ions) and virulence factors by these mobile genetic elements and prophages within the plasmids. Comparison of the ST395 P8 and ST395 P18 genomes reveals evidence of recombination in hot spots characterized by E.R. Shaidullina et al. [5]. The O-antigen, ICEKp and prophage regions differ among isolates. Isolate ST395 P18 has ICEKp12 (ybt16) prevalent in CG305 and in subclade B1 (KL2KL30) [5], with the K-locus characterization of the isolate corresponding to that of the subclade. In the ST395 P8 isolate, ICEKp5 (ybt14) is rare [5] and belongs to subclade A1 (KL108). However, the ST395 P8 isolate contains a KL2 K-locus, which may be further evidence of recombination events.

In CG307 isolates, differences in the set of resistance genes are associated with a different plasmid profile. In the chromosome, the isolates contain the same ICEKp4 (ybt10) regions, but significant differences in the main recombination hot spot, the K- and O-loci.

In SL29, the isolates are similar only in the O-locus, have different K-loci, ICEKp, plasmid profile and resistance gene spectrum. It is important to note that the single plasmid of isolate ST985 (IncFIB(K)) contains 3 heavy metal ion resistance operons and a large list of genes that define together with genes of the chromosome pandrug-resistance of the isolate.

ST866 isolates, while being the least resistant, are nevertheless MDR and XDR, carrying plasmids containing 2 operons of resistance to heavy metal ions.

Returning to the actual problem of resistance of *K. pneumoniae* to carbapenems, it is necessary to note the presence of 2 isolates containing 2 carbapenemase genes each: OXA-48 and NDM-1, in the sample. The isolates belong to international high-risk clones CG395 and CG307.

Thus, in the sample of resistant isolates of *K. pneumoniae* isolated from bloodstream and cerebrospinal fluid, 6 PDR isolates were detected, one of which belongs to the convergent pathotype ST395.

¹² Institut Pasteur. URL: bigsd.bpasteur.fr/klebsiella

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Белобородов В.Б., Голощанов О.В., Гусаров В.Г. и др. Методические рекомендации Российской некоммерческой общественной организации «Ассоциация анестезиологов-реаниматологов», Межрегиональной общественной организации «Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов», Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), общественной организации «Российский Сепсис Форум» «Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов» (обновление 2022 г.). *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2022;19(2):84–114. Beloborodov V.B., Goloschapov O.V., Gusarov V.G., et al. Guidelines of the Association of anesthesiologists-intensivists, the Interregional non-governmental organization Alliance of clinical chemotherapists and microbiologists, the Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC), and NGO Russian sepsis forum diagnostics and antimicrobial therapy of the infections caused by multiresistant microorganisms (update 2022). *Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*. 2022;19(2):84–114. DOI: <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2022-19-2-84-114> EDN: <https://elibrary.ru/vjuogq>
2. Khrulnova S., Fedorova A., Frolova I., et al. Distribution of virulence genes and capsule types in *Klebsiella pneumoniae* among bloodstream isolates from patients with hematological malignancies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2022;104(1):115744. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115744>
3. Fursova A.D., Fursov M.V., Astashkin E.I., et al. Early response of antimicrobial resistance and virulence genes expression in classical, hypervirulent, and hybrid hvKp-MDR *Klebsiella pneumoniae* on antimicrobial stress. *Antibiotics (Basel)*. 2021;11(1):7. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010007>
4. Fursova N.K., Astashkin E.I., Ershova O.N., et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing severe infections in the Neuro-ICU. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(8):979. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080979>
5. Shaidullina E.R., Schwabe M., Rohde T., et al. Genomic analysis of the international high-risk clonal lineage *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395. *Genome Med.* 2023;15(1):9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01159-6>
6. Gu D., Dong N., Zheng Z., et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 2018;18(1):37–46. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9)
7. Starkova P., Lazareva I., Avdeeva A., et al. Emergence of hybrid resistance and virulence plasmids harboring New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(6):691. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060691>
8. Khedkar S., Smyshlyayev G., Letunic I., et al. Landscape of mobile genetic elements and their antibiotic resistance cargo in prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(6):3155–68. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac163>
9. Johnson C.M., Grossman A.D. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu. Rev. Genet.* 2015;49:577–601. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
10. Shapaka J.T., Mulojiwa R., Buys H. Association of full blood count findings with risk of mortality in children with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection at a South African children's hospital. *BMC Pediatr.* 2023;23(1):302. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12887-023-04104-z>
11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1; 2023. URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf
12. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., et al. Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(3):268–81. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
13. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001;Chapter 2:Unit2.4. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>
14. Grant J.R., Stothard P. The CGView Server: A comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W181–4. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn179>
15. Brettin T., Davis J.J., Disz T., et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* 2015;5:8365. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08365>
16. Li W., O'Neill K.R., Haft D.H., et al. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D1020–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1105>
17. Arndt D., Grant J.R., Marcu A., et al. PHASTER: A better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16–21. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
18. Lam M.M.C., Wick R.R., Watts S.C., et al. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat. Commun.* 2021;12(1):4188. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24448-3>
19. Lam M.M.C., Wick R.R., Judd L.M., et al. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex. *Microb. Genom.* 2022;8(3):000800. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000800>
20. Chen L., Yang J., Yu J., et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Issue suppl. 1):D325–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>
21. Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D690–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
22. Olson R.D., Assaf R., Brettin T., et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D678–89. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
23. Carattoli A., Zankari E., García-Fernández A., et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(7):3895–903. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
24. Follador R., Heinz E., Wyres K.L., et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb. Genom.* 2016;2(8):e000073. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>
25. Pan Y.J., Lin T.L., Chen C.T., et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci. Rep.* 2015;5:15573. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep15573>
26. Liu C., Du P., Xiao N., et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* is emerging as an increasingly prevalent *K. pneumoniae* pathotype responsible for nosocomial and healthcare-associated infections in Beijing, China. *Virulence.* 2020;11(1):1215–24. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809322>

27. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 2014;5:643.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
28. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2013;1277:91–104.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x>
29. Wu F., Ying Y., Yin M., et al. Molecular characterization of a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain R46 iso-

- lated from a rabbit. *Int. J. Genomics.* 2019;2019:5459190.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/5459190>
30. Fernandes S., São-José C. More than a hole: the holin lethal function may be required to fully sensitize bacteria to the lytic action of canonical endolysins. *Mol. Microbiol.* 2016;102(1):92–106.
DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.13448>
31. Balcazar J.L. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004219.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004219>

Information about the authors

Olga L. Voronina — Cand. Sci. (Biol.), Assistant Professor, Head, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, olv550@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Marina S. Kunda — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Natalia N. Ryzhova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Ekaterina I. Aksenova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of genome analysis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

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

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

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

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

Andrey P. Fisenko — D. Sci. (Med.), Professor, Director, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8586-7946>

Alexander L. Gintsburg — D. Sci. (Biol.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Author contribution: Voronina O.L. — methodology and design of genomic research, bioinformatic analysis, writing and editing the manuscript; Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I. — genomic studies, bioinformatics and statistical analysis, visualization, manuscript writing; Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Lazareva A.V. — isolation of microorganism cultures and phenotypic study, participation in the preparation of the manuscript; Karaseva O.V. — organization of the collection and processing of clinical material; Fisenko A.P. — conceptualization of research at the National Medical Research Center for Children's Health; Gintsburg A.L. — conceptualization and coordination of the study. 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 06.09.2023;
accepted for publication 15.11.2023;
published 28.12.2023

Информация об авторах

Воронина Ольга Львовна — к.б.н., доцент, зав. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olv550@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Кунда Марина Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Рыжова Наталья Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Аксенова Екатерина Ивановна — к.б.н., с.н.с. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

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

Новикова Ирина Евгеньевна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4234-0209>

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

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

Фисенко Андрей Петрович — д.м.н., профессор, директор НИИЦ здоровья детей, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8586-7946>

Гинцбург Александр Леонидович — д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Вклад авторов: Воронина О.Л. — методология и дизайн геномного исследования, биоинформационный анализ, написание и редактирование рукописи; Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И. — геномные исследования, биоинформационный и статистический анализ, визуализация, написание рукописи; Садеева З.З., Новикова И.Е., Лазарева А.В. — выделение культур микроорганизмов и фенотипическое исследование, участие в подготовке рукописи; Карасева О.В. — организация сбора клинического материала; Фисенко А.П. — концептуализация исследования в НИИЦ здоровья детей; Гинцбург А.Л. — концептуализация и координация исследования. 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 06.09.2023;
принята к публикации 15.11.2023;
опубликована 28.12.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-427>

Results of screening for antibodies to varicella-zoster virus in healthcare workers of a multidisciplinary hospital in Moscow

Nataliya M. Afonina¹, Irina V. Mikheeva^{1✉}, Marina I. Korabelnikova¹, Zinaida S. Rodionova¹, Artem V. Snitsar^{2,3}, Sergey N. Perekhodov³, Svetlana V. Smetanina², Alexey V. Tutelyan¹, Stanislav N. Kuzin¹, Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²City Clinical Hospital named after V.P. Demikhov, Moscow, Russia;

³A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Given the unfavorable epidemic situation with chickenpox and shingles in Russia, there is a high risk of virus introduction and spread in healthcare settings, including among medical staff who are not immune to varicella zoster virus (VZV).

The objective of this study is to assess the immunity of employees of a multidisciplinary hospital in Moscow to VZV.

Materials and methods. A selective screening study was carried out. Venous blood serum samples were taken from 1546 hospital employees as material for detection of IgG antibodies to VZV antigens using a commercial solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) test system "Vecto VZV-IgG". All employees were questioned to obtain information about their infectious and vaccine history in relation to VZV.

Results and discussion. Screening for antibodies to VZV in the hospital workers revealed that 6.3% of those workers are not immune to VZV. The proportion of seronegative individuals was the highest ($12.6 \pm 2.4\%$) in the age group of 29 years and younger. VZV seronegative healthcare workers were found in various departments, but the presence of non-immune individuals among the staff of the obstetrics and gynecology departments (6.5%) is of epidemiologic concern. The results of the survey showed that documented data on infection and vaccination history cannot be used to assess the protection of healthcare workers against VZV infection.

Conclusion. The results of serologic screening for antibodies to VZV made it possible to identify a significant number of susceptible employees of the multidisciplinary hospital. In order to prevent the formation of multiple epidemic foci of varicella in medical organizations, it is advisable to include anti-VZV testing of medical staff in the state prevention programs with subsequent vaccination of non-immune individuals.

Keywords: *varicella, chickenpox, immunity, healthcare workers, serosurveillance, preventive vaccination*

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. 114, April 22, 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: Afonina N.M., Mikheeva I.V., Korabelnikova M.I., Rodionova Z.S., Snitsar A.V., Perekhodov S.N., Smetanina S.V., Tutelyan A.V., Kuzin S.N., Akimkin V.G. Results of screening for antibodies to varicella-zoster virus in healthcare workers of a multidisciplinary hospital in Moscow. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2023;100(6):410–419.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-427>

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

Результаты скрининга на антитела к вирусу ветряной оспы у медицинских работников многопрофильного стационара Москвы

Афони́на Н.М.¹, Михеева И.В.^{1✉}, Корабельникова М.И.¹, Родионова З.С.¹, Сницарь А.В.^{2,3}, Переходов С.Н.³, Сметанина С.В.², Тутельян А.В.¹, Кузин С.Н.¹, Акимкин В.Г.¹

¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

²Городская клиническая больница имени В.П. Демикова, Москва, Россия;

³Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. В условиях неблагоприятной эпидемической ситуации по ветряной оспе и опоясывающему лишая в России в медицинских организациях существует высокий риск заноса вируса и его распространения, в том числе среди неиммунного к вирусу ветряной оспы (VZV) медицинского персонала.

Цель исследования — оценка иммуноструктуры работников многопрофильного стационара Москвы к VZV.

Материалы и методы. Проведено выборочное скрининговое исследование. Материалами для исследования методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с выявлением специфических антител к антигенам VZV IgG с использованием коммерческой иммуноферментной тест-системы «Векто VZV-IgG» являлись образцы сыворотки венозной крови 1546 работников многопрофильного стационара Москвы. Проведено анкетирование всех сотрудников для получения информации об инфекционном и вакцинальном анамнезе в отношении VZV.

Результаты и обсуждение. Скрининг на антитела к VZV у медицинских работников многопрофильного стационара выявил наличие 6,3% неиммунных к вирусу ветряной оспы. В возрастной группе до 29 лет включительно удельный вес серонегативных лиц был наибольшим ($12,6 \pm 2,4\%$). Серонегативные к VZV медработники выявлены в отделениях разного профиля, однако эпидемиологическую настороженность вызывает наличие неиммунных лиц среди сотрудников акушерско-гинекологических отделений (6,5%). Результаты опроса показали, что документально не подтверждённые данные инфекционного и прививочного анамнеза не могут быть использованы при оценке защищённости медицинских работников от VZV-инфекции.

Заключение. Результаты серологического скрининга на антитела к VZV позволили выявить значительное число восприимчивых к инфекции сотрудников многопрофильного стационара. Для предотвращения формирования множественных эпидемических очагов ветряной оспы в медицинских организациях целесообразно внесение в государственные программы профилактики тестирования на анти-VZV медицинского персонала с последующей вакцинацией неиммунных лиц.

Ключевые слова: ветряная оспа, вирус ветряной оспы, иммунитет, медицинские работники, серомониторинг, вакцинопрофилактика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 114 от 22.04.2021).

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: Афони́на Н.М., Михеева И.В., Корабельникова М.И., Родионова З.С., Сницарь А.В., Переходов С.Н., Сметанина С.В., Тутельян А.В., Кузин С.Н., Акимкин В.Г. Результаты скрининга на антитела к вирусу ветряной оспы у медицинских работников многопрофильного стационара Москвы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):410–419.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-427>

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

Introduction

Despite significant advances in infection control at healthcare organizations (HCOs) through a wide range of sanitary and epidemiological measures and preventive vaccination, infectious diseases still pose a serious threat to patients and healthcare staff. In this regard, attention should be focused on HCO employees who have not previously contracted vaccine-preventable diseases and have not been vaccinated before entering the workplace, as they are at risk of infection and subsequently at risk of becoming a source of the pathogen for susceptible seronegative patients [1].

In Russia, the most widespread infectious diseases (apart from acute respiratory viral infections) are diseases caused by Varicella zoster virus (*VZV*) — chickenpox and shingles. In 2022, more than 648,000 cases of chickenpox and 16,680 cases of shingles were registered in the country. Children account for the majority of cases of chickenpox (95.6%), and adults account for 91.5% of the age structure of patients with shingles [2].

In the current epidemic situation in the HCO, there is a high risk of *VZV* entry and spread, including among medical staff who are non-immune to *VZV*.

There are no precise statistical data on the frequency of hospitalization of chickenpox and shingles patients in Russia. At the same time, when studying the frequency of hospitalization of herpesvirus patients in the Moscow Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 for the years 2010–2021, the predominance of hospitalized *VZV*-infected adults was established: 5162 adults with *VZV* (4705 — diagnosed with shingles and 357 — with chickenpox) [3] and 226 children (196 — diagnosed with chickenpox and 30 — with shingles) were hospitalized during the studied period [4].

Foreign literature has published data that the circulation of *VZV* in pediatric HCOs is decreasing due to the infrequent hospitalization of children for chickenpox due to routine preventive vaccination for chickenpox in the pediatric population [5]. However, *VZV* is actively circulating in adult HCOs and the source of the pathogen is predominantly patients with shingles [6–9]. Due to erroneous stereotypical beliefs that chickenpox is predominantly a pediatric disease and infection is only spread from chickenpox patients, those with shingles are often overlooked as *VZV* sources. For this reason, the risks of infection and spread of chickenpox in adult HCOs are underestimated.

Chickenpox in patients with hospital-acquired infections is characterized by high intensity of spread, aggravation of the course and development of complications [10]. Foreign authors have noted that outbreaks of chickenpox in hospitalized patients are associated not only with severe consequences for patients, but also with a significant financial burden for the hospital, as well as with lawsuits from exposed patients [11, 12].

In this regard, it is extremely important to exclude the possibility of spreading chickenpox among non-im-

mune medical staff, therefore, immunization against chickenpox in a number of countries is regulated for seronegative employees [13, 14].

In Russia, despite the unfavorable epidemic situation with chickenpox and shingles, healthcare workers do not undergo mandatory serological testing for antibodies to *VZV* with subsequent vaccination of non-immune workers and there is no data on the immunity to the chickenpox pathogen in this group of the increased occupational risk of infection.

At the same time, the World Health Organization recommends immunization against chickenpox in non-immune healthcare workers [15].

Taking into account the relevance of the problem, a study was conducted to assess the immunity of employees of a multidisciplinary hospital in Moscow to *VZV*.

Materials and methods

A selective screening study was conducted. In the year 2021, venous blood serum samples were taken from 1546 hospital employees of one of the multidisciplinary hospitals in Moscow as material for this study. All employees gave voluntary informed written consent to participate in the study. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor (protocol No. 114 of 22.04.2021). The socio-demographic characteristics of the clinical study group are presented in Table 1.

The qualitative detection of IgG antibodies to *VZV* antigens was performed using a commercial solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test system "Vecto *VZV*-IgG". The testing was performed according to the screening method in a single dilution (1 : 100) of serum samples. In accordance

Table 1. Characteristics of the studied group ($n = 1546$)

Parameter		Number of respondents	
		abs.	%
Sex	women	1338	86,5
	men	208	13,5
Age, years	≤ 29	190	12,3
	30–39	350	22,6
	40–49	413	26,7
	50–59	372	24,1
	> 60	221	14,3
Work experience, years	< 10	454	29,3
	10–20	360	23,4
	20–30	309	19,9
	> 30	304	19,7
	not indicated	119	7,7

with the instructions to the test system, the obtained results were interpreted as positive or negative when correlating the testing results to the manufacturer's standard panel with or without IgG antibodies to *VZV*.

The study also included a questionnaire survey of all employees to obtain information on infection and vaccine history related to *VZV*.

Confidence intervals with a significance level of 95% were calculated to assess the statistical significance of differences in relative indices. Graphical processing of the data was performed using the MS Excel program.

Results

Among the staff of a multidisciplinary hospital in Moscow, 1448 (93.4%) employees immune to *VZV* and 98 (6.3%) employees without antibodies to *VZV* were identified.

The proportion of seronegative individuals among women and men was almost the same: among women – $6.7 \pm 1.4\%$ ($n = 89$), among men – $4.3 \pm 0.7\%$ ($n = 9$), the difference of indicators was statistically unreliable ($t = 1.6$; $p \leq 0.05$).

The analysis of the *VZV* immunity level by age groups showed that in the group up to 29 years of age, every 8th hospital employee lacked the antibodies to *VZV* (24 out of 190), and in the age group over 30 years of age, it was every 18th employee (74 out of 1356).

The proportion of *VZV* seropositive healthcare workers in the age group of 30 years and older was $94.5 \pm 0.6\%$, which was significantly higher than in the group of young healthcare workers up to 29 years of age ($87.4 \pm 2.4\%$; $t = 2.7$; $p \leq 0.05$). Within the age group of 30 years and older, seropositivity rates had no statistically significant differences (Fig. 1).

The results of the study indicate a higher probability of chickenpox in young specialists compared to older medical workers.

In order to assess the risk of infection of seronegative individuals during the work period in the HCO, the immunity was assessed in groups of staff, depending on the years of service in the specialty.

In the groups of hospital staff with less than 10 and up to 20 years of service in the HCO, the proportion of individuals without antibodies to *VZV* was higher than among staff with 20-30 and more than 30 years of service: 6.4 ± 1.1 and $8.3 \pm 1.5\%$ vs. 3.9 ± 1.1 and $4.3 \pm 1.2\%$, respectively ($p \leq 0.05$; Fig. 2).

VZV seronegative healthcare workers were found in all hospital departments. The immunity to *VZV* in different departments ranged from 92.7% in surgical departments to 95.0% in the outpatient center and other departments. Statistical processing of the results showed that there was no significant difference between the proportion of seronegative/seropositive workers in different hospital departments ($p \leq 0.05$; Table 2; Fig. 3).

In this study, the infectious history of healthcare workers and vaccination history related to chickenpox were studied. Due to the lack of documents confirming the fact of disease or vaccination (chickenpox recovery and immunization certificates), the assessment was based on a questionnaire survey of healthcare workers (1546 respondents).

About 40% of health workers (604 respondents) reported that they had previously experienced chickenpox, 42% (666 respondents) did not know about their infection and vaccination history, and 18% (276) considered themselves vaccinated against chickenpox. Employees of the therapeutic, obstetrics and gynecology departments considered themselves vaccinated

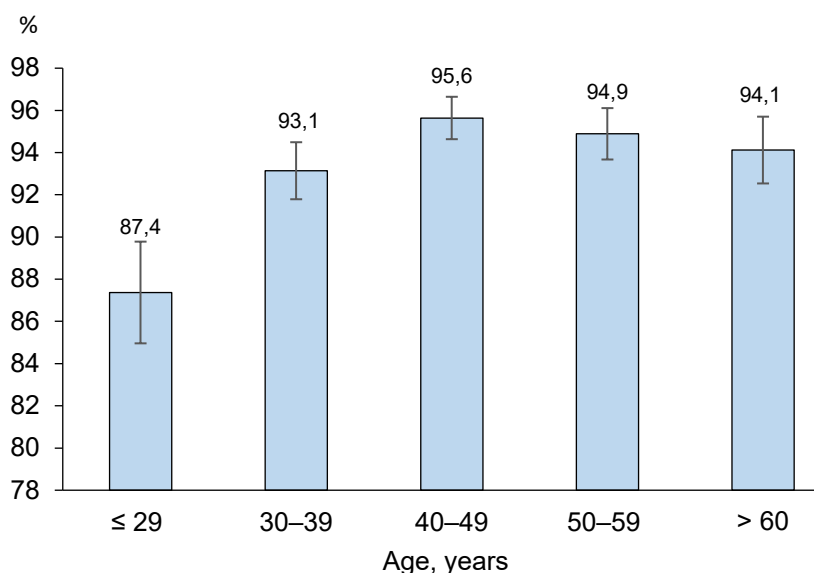


Fig. 1. The proportion of *VZV* seropositive cases in different age groups of healthcare workers of a multidisciplinary hospital in Moscow.

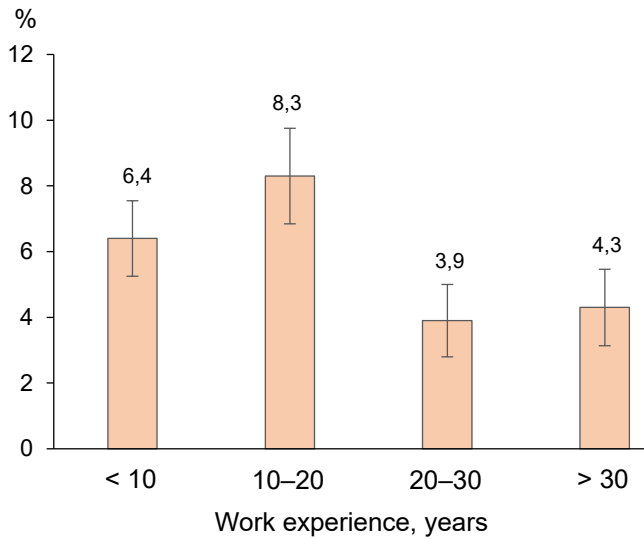


Fig. 2. The proportion of VZV seronegative healthcare workers of a multidisciplinary hospital in Moscow, depending on the years of service.

in a significantly lower proportion of cases (7.0% and 4.8%, respectively) compared to employees of other departments (19.3% in surgical departments, 42.9% in diagnostic departments, 33% in administrative departments, and 41.6% in other departments); the differences were statistically significant ($p < 0.05$). Taking into account the absence of vaccination against chickenpox in the National Immunization Calendar of Russia, as well as insignificant volumes of vaccination against this infection by epidemic indications, the adequacy of the obtained employee questionnaire results regarding previous vaccination against chickenpox is questionable. The unreliability of the vaccination history was indirectly confirmed by the almost identical proportion of seronegative individuals among the supposedly vaccinated and those with an unknown history: 8.7 ± 1.7 and $9.9 \pm 1.2\%$, respectively ($t = 0.6$; $p \leq 0.05$).

Comparison of the questionnaire data with the results of serologic screening showed that $1.3 \pm 0.5\%$ of individuals without antibodies to VZV were found among healthcare workers who considered themselves to have been previously infected with chickenpox, while 6.5 times more seronegative persons were found among those who reported being vaccinated against chickenpox ($8.7 \pm 1.7\%$; $t = 4.1$; $p \leq 0.05$; **Table 3**).

Discussion

Screening for antibodies to VZV in medical workers of a multidisciplinary hospital revealed a high proportion of seropositive individuals (93.7%). Taking into account that the study involved individuals of a certain vulnerable population group (employees of the HCO), we did not extrapolate the results of the screening to the adult population of the country. At the same time, the obtained result is comparable with the data of population studies on assessment of immunity to VZV in European countries, indicating that more than 90% of adults in most of them are VZV seropositive. At the same time, the level of adult seropositivity is higher than in most Asian countries with warmer climates (India — 68.2%, Turkey — 77.8%, Thailand — 61.4%, Iran — 78.5%, etc.) [16].

Despite the high level of herd immunity to VZV identified in this study, the probability of infection of healthcare workers in the event of the pathogen introduction was shown: 98 medical staff did not have immunity to VZV. At the same time, in the case of chickenpox infection, medical staff may become a source of the infection for weakened in-patients, whose chickenpox is extremely severe.

The probability of VZV infection spread and the formation of multiple foci of VZV infection among the staff and patients of multidisciplinary hospitals is proved by the results of an assessment of the nosocomial incidence of chickenpox infection in the Moscow HCO [17, 18].

Table 2. Results of serological testing for antibodies to VZV of healthcare workers in various departments of a multidisciplinary hospital in Moscow

Department profile	Number of examined persons				
	total	of which seronegative		of which seropositive	
		abs.	% ($P \pm mp$)	abs.	% ($P \pm mp$)
Surgical	450	33	7.3 ± 1.2	417	92.7 ± 1.2
Obstetrics and gynecology	186	12	6.5 ± 1.8	174	93.5 ± 1.8
Therapeutical	499	31	6.2 ± 1.1	468	93.8 ± 1.1
Diagnostic	133	8	6.0 ± 2.1	125	94.0 ± 2.1
Administrative and economic	97	5	5.2 ± 2.2	92	94.8 ± 2.2
Outpatient clinic center	80	4	5.0 ± 2.4	86	95.0 ± 2.4
Other (reception, narcological, etc.)	101	5	5.0 ± 2.2	96	95.0 ± 2.2
Total	1546	98	6.3	1448	93.4

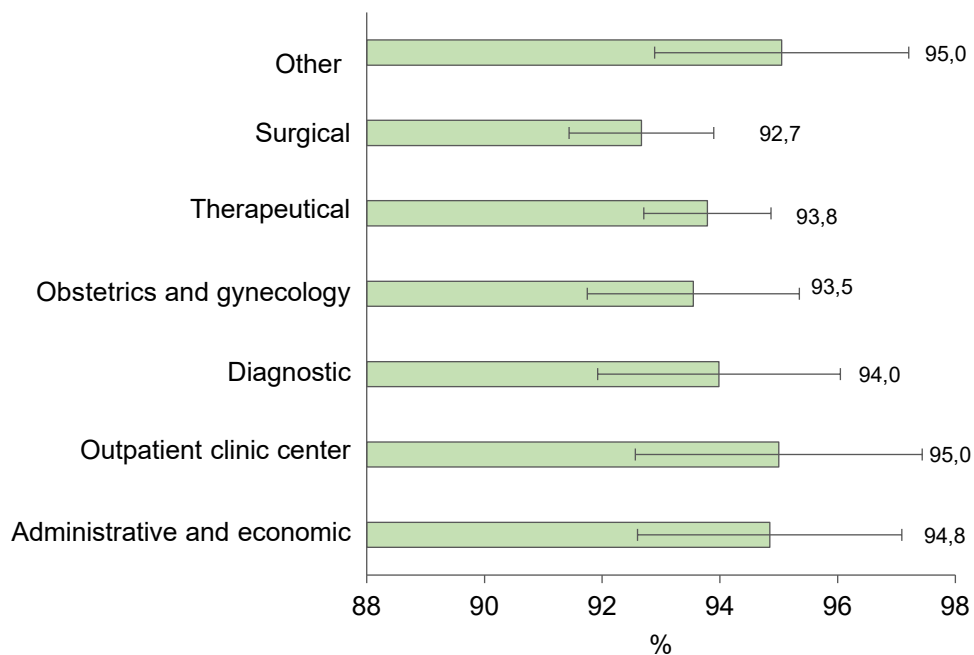


Fig. 3. The proportion of VZV seropositive healthcare workers in various departments of a multidisciplinary hospital in Moscow.

The risk of VZV entry into non-infectious adult hospitals is evidenced by the data on the frequency of hospitalization of patients with shingles, which are the sources of the chickenpox pathogen. In particular, our earlier epidemiological study showed that in Moscow, 30% of all patients with shingles (more than 300 people annually) were admitted to hospitals, and in the vast majority of cases, admitted to non-infectious wards [17].

The results obtained, which demonstrated that there was no statistically significant difference in the proportion of seronegative/seropositive individuals among women and men in the studied cohort, are consistent with the literature data that chickenpox occurs with equal frequency in males and females [19], as well as with the results of serologic studies indicating that there is no difference in the proportion of VZV seropositive cases among individuals of different sexes [16].

The study of the immunity by age groups, which showed that the proportion of VZV seropositive in-

dividuals in the age group up to 29 years of age was significantly lower than among medical staff 30 years and older (87.4 ± 2.7 vs. $94.5 \pm 0.6\%$), confirmed the previously published serosurvey data on the increase in the proportion of VZV seropositive individuals with age [16, 20]. Comparable results were also obtained in 2014 when studying the immunity of the Moscow population to VZV: among adults of childbearing age aged 20-29 years, the proportion of seropositive individuals was $88.2 \pm 5.5\%$ [21].

The data obtained objectively indicate the presence of a higher probability of chickenpox disease in young hospital staff compared to healthcare workers from older age groups. However, taking into account the age structure of the hospital staff, in which the proportion of persons aged 30 years and older was more than 87% (Table 1), the number of persons without detectable antibodies to VZV among mature-age persons was significant in absolute terms: 74 out of 98 non-im-

Table 3. Results of serological screening of medical workers with various infectious and vaccine histories regarding chickenpox based on the results of a questionnaire

Anamnesis based on the results of the questionnaire	Number of respondents		
	total	of which seronegative	
		abs.	% (P ± mp)
Have had chickenpox before	604	8	1,3 ± 0,5
Consider themselves vaccinated against chickenpox	276	24	8,7 ± 1,7
Have no information	666	66	9,9 ± 1,2
Total	1546	98	6,3

mune persons detected. Therefore, when conducting anti-epidemic measures in case of chickenpox introduction into the hospital from the groups at risk of disease development, medical workers of older age groups cannot be excluded.

Working in a non-infectious HCO is itself a factor of increased risk of contact with a patient with inapparent or latent *VZV* infection. However, data from this study has shown that many years of service in the HCO is not a definite evidence of post-infection immunity to chickenpox infection, because among the employees with more than 20 years of service there were found persons without antibodies to the chickenpox pathogen.

When studying the immunity of healthcare workers of different departments of a multidisciplinary hospital, approximately the same proportion of employees immune to *VZV* was established. At the same time, it is known that the probability of *VZV* introduction is higher in those departments of a multidisciplinary hospital where patients with clinical manifestations characteristic of shingles are hospitalized. The most frequent complications of shingles requiring hospitalization of patients are post-herpetic neuralgia, bacterial infections, eye damage, neurological complications and generalization of infection. Moreover, among elderly individuals with shingles, the incidence of hospitalization is increasing annually [20]. Thus, the risks of *VZV* infection are higher in wards with a high proportion of elderly patients (therapeutic and neurological wards), as well as in wards and hospitals with long stays of debilitated patients (psychiatric and phthisiatric wards).

The presence of non-immune staff in obstetrics and gynecology departments (12 people; 6.5%), where the risk of chickenpox outbreaks is associated with the risk of infection of pregnant women and newborns, should be of particular epidemiologic concern.

In a study conducted in Poland, which included questionnaires and serologic screening for IgG antibodies to *VZV* of 524 physicians, midwives, and nurses in maternity, neonatal and pediatric units, 14.7% of potentially seronegative healthcare workers were identified, which was twice as high as in our study [22]. We assume that this is due to different methods of assessing the state of humoral immunity: in our study, only qualitative assessment (positive or negative for IgG antibodies to *VZV*) was performed and the level of immunity was not taken into account. However, in the study described above, quantitative assessment was performed and employees with a concentration of specific IgG antibodies ≥ 5 IU/mL were classified as seropositive individuals [22]. Thus, the influence on the results of serologic screening of the selected methodology of antibody detection and sensitivity of the employed ELISA test systems should be taken into account.

Comparison of the questionnaire data of medical staff conducted within the framework of the present study with the results of serologic screening shows the

unreliability of the anamnestic data not supported by documents. This is demonstrated both by the almost equal percentage of seronegative persons among those supposedly vaccinated and those with unknown history, and by the detection of seronegative persons in the group of those who had been previously infected.

We believe that the information on previous vaccination against chickenpox obtained during the employee questionnaire does not reflect the true situation, since the National Immunization Calendar of Russia does not provide for routine vaccination against chickenpox, and vaccinations against this infection have been carried out since 2013 to a very limited contingent of risk groups, not including healthcare workers. It is likely that some employees may mistakenly believe that they have been immunized against chickenpox without documentation of their preventive vaccinations. However, this may indirectly indicate a lack of competence of healthcare professionals in the field of immunoprophylaxis of infectious diseases.

Previous studies have shown that, due to the possibility of an inapparent course of chickenpox, the absence of a history of chickenpox is not necessarily associated with the absence of IgG antibodies to *VZV* [21], and the presence of this infection in the history does not guarantee the presence of antibodies due to possible clinical diagnostic errors in the absence of laboratory confirmation of the diagnosis [21, 22].

Thus, in the course of the questionnaire survey it was demonstrated that medical workers are not always able to present their reliable infection and vaccination history, and its objective confirmation can be obtained only by testing for antibodies to *VZV*.

In the absence of routine vaccine prophylaxis to prevent nosocomial spread of infection, it seems reasonable to organize serological monitoring of immunity to *VZV* through a single test (screening) of all employees, and in the future, on a regular basis, to conduct serological examination only of persons newly hired to work in the HCO. Detected seronegative persons should be vaccinated against chickenpox regardless of age. Such an approach will significantly reduce the costs of anti-epidemic measures in case of *VZV* introduction into the HCO, as well as reduce the risk of pathogen entry due to the disease of employees.

Immunization against chickenpox, recommended by WHO since the 1990s, is the gold standard for chickenpox prophylaxis. Currently, WHO recommends immunization against chickenpox for all healthcare workers who are not immune to *VZV*, but if it is not economically feasible, only staff in obstetrics and gynecology departments may be immunized, because chickenpox poses a serious threat to maternal, fetal and neonatal health and because of the fact that post-exposure immunization of pregnant women is not possible [15].

In the European region, 13 countries recommend immunization against chickenpox for healthcare work-

ers who have not been serologically tested for antibodies to *VZV*¹.

In the United States, all healthcare staff should have documented immunity to *VZV*, as evidenced by either double immunization against chickenpox, the presence of antibodies to *VZV*, or a physician-confirmed history of chickenpox or shingles [14].

Domestic authors have also indicated that it is advisable to vaccinate healthcare workers who have not previously had chickenpox [10]. However, the issues of laboratory confirmation of immunity to *VZV* are still unresolved in Russian healthcare practice.

Given the difficulties in procuring foreign vaccines for chickenpox prophylaxis and test systems to determine the level of immunity to *VZV*, the development and introduction of domestic test systems and domestic chickenpox vaccines into the public health practice is crucial for the implementation of such an initiative.

Summary of results

1. Serologic screening for antibodies to *VZV* showed both a high level of herd immunity (93.7%) among medical staff of a multidisciplinary hospital in Moscow and the presence of seronegative individuals susceptible to chickenpox among employees of various departments, all age groups and with different years of service.

2. Significantly more *VZV* seronegative individuals were found among staff under 29 years of age than among healthcare workers in older age groups and with more years of service.

3. The level of immunity to *VZV* was found to be approximately the same among multidisciplinary hospital workers of different departments.

4. The questionnaire demonstrated that healthcare workers could not present their reliable infection and vaccination history regarding chickenpox, and its objective confirmation could only be obtained by testing for antibodies to *VZV*.

5. The necessity of introducing preventive vaccination against chickenpox, including in medical workers, as well as the relevance of creating a serological monitoring system of immunity to *VZV* in employees of the HCO in order to prevent the entry of the pathogen and to optimize anti-epidemic measures in case of infection outbreak are shown.

Conclusion

The results of serologic screening for antibodies to *VZV* revealed the presence of susceptible individuals among the staff of a multidisciplinary hospital, which indicates the presence of conditions for the pathogen introduction with sick medical staff and the formation of epidemic foci of chickenpox in non-infectious HCOs.

Taking into account the obtained results, it is necessary to develop and put into practice domestic vaccines against chickenpox, as well as domestic test systems for serosurveillance of *VZV* infection. At the initial stage of introducing preventive vaccination for chickenpox, it is advisable to conduct serologic testing for antibodies to *VZV* in medical staff with subsequent vaccination of non-immune individuals.

In the context of planning the inclusion of vaccinations against chickenpox in the National Immunization Calendar of Russia, the obtained data are of interest regarding the use of serologic methods to assess the prevalence of *VZV* infection in order to obtain data on the disease risk groups and improve measures to counteract the infection.

¹ European Centre for Disease Prevention and Control, Varicella vaccination in the European Union. Stockholm ECDC. 2015. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/Varicella-Guidance-2015.pdf> (дата обращения: 13.05.2023).

REFERENCES

- Sydnor E., Perl T.M. Healthcare providers as sources of vaccine-preventable diseases. *Vaccine*. 2014;32(38):4814–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.097>
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации в 2022 году». М.; 2023.
- Орадовская И.В., Викулов Г.Х., Колобухина Л.В. и др. Герпесвирусные инфекции у взрослых жителей г. Москвы: заболеваемость, распространенность, нозологические формы и алгоритм ведения. *Инфекционные болезни*. 2022;20(4):125–42. Oradovskaya I.V., Vikulov G.Kh., Kolobukhina L.V., et al. Herpesvirus infections in adult residents of Moscow: incidence, prevalence, nosological forms and algorithm of management. *Infectious Diseases*. 2022;20(4):125–42. DOI: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-4-125-142>
- Викулов Г.Х., Орадовская И.В., Колобухина Л.В. Герпесвирусные инфекции у детей: распространенность, заболеваемость, клинические формы и алгоритмы ведения. *Вопросы практической педиатрии*. 2022;17(6):125–142. Vikulov G.Kh., Oradovskaya I.V., Kolobukhina L.V. Herpesvirus infections in children: prevalence, incidence, clinical forms, and management algorithm. *Clinical Practice in Pediatrics*. 2022;17(6):125–142. DOI: <https://doi.org/10.20953/1817-7646-2022-6-126-140>
- Helmuth I.G., Poulsen A., Suppli C.H., Mølbak K. Affiliations expand Varicella in Europe—A review of the epidemiology and experience with vaccination. *Vaccine*. 2015;33(21):2406–13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.055>
- Breuer J. Herpes zoster: new insights provide an important wake-up call for management of nosocomial transmission. *J. Infect. Dis*. 2008;197(5):635–7. DOI: <https://doi.org/10.1086/527421>
- Johnson J.A., Bloch K.C., Dang B.N. Varicella reinfection in a seropositive physician following occupational exposure to localized zoster. *Clin. Infect. Dis*. 2011;52(7):907–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cir033>
- Lopez A.S., Burnett-Hartman A., Nambiar R. Transmission of a newly characterized strain of varicella-zoster virus from a patient with herpes zoster in a long-term-care facility, West Virginia, 2004. *J. Infect. Dis*. 2008;197(5):646–53. DOI: <https://doi.org/10.1086/527419>
- Saidel-Odes L., Borer A., Reisenberg K., et al. An outbreak of varicella in staff nurses exposed to a patient with localized herpes zoster. *Scand. J. Infect. Dis*. 2010;42(8):620–2. DOI: <https://doi.org/10.3109/00365541003754436>
- Литяева Л.А., Тен М.Б., Ковалева О.В., Закопаева Е.С. Особенности течения ветряной оспы у детей с иммунодефицитными состояниями. *Детские инфекции*. 2015;14(4):50–2. Lityaeva L.A., Ten M.B., Kovaleva O.V., Zakopaeva E.S. Peculiarities of varicella in children with immunodeficiency. *Children Infections*. 2015;14(4):50–2. DOI: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2015-14-4-50-52> EDN: <https://elibrary.ru/uxqebp>
- Daley A.J., Thorpe S., Garland S.M. Varicella and the pregnant woman: prevention and management. *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynaecol*. 2008;48(1):26–33. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2007.00797.x>
- Sarit S., Shruti S., Deepinder C., Chhina R.S. Chicken pox outbreak in the Intensive Care Unit of a tertiary care hospital: lessons learnt the hard way. *Indian J. Crit. Care Med*. 2015;19(12):723–5. DOI: <https://doi.org/10.4103/0972-5229.171397>
- Talebi-Taher M., Noori M., Shamshiri A.R., Barati M. Varicella Zoster antibodies among health care workers in a university hospital, Teheran, Iran. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 2010;23(1):27–32. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10001-010-0011-x>
- Centers for Disease Control and Prevention. Immunization of health care personnel: recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (AICP). *MMWR Recomm. Rep*. 2011;60(RR-7):1–45.
- WHO. Varicella and herpes zoster vaccines: WHO position paper; 2014. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-8925-265-288>
- Amjadi O., Rafiei A., Haghshenas M., et al. A systematic review and meta-analysis of seroprevalence of varicella zoster virus: A nationwide population-based study. *J. Clin. Virol*. 2017;87:49–59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.12.001>
- Афонина Н.М. Эпидемиологическая характеристика и меры профилактики инфекции, вызванной вирусом *Varicella zoster*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2019. Afonina N.M. *Epidemiological characteristics and measures of prevention of infection caused by the Varicella zoster virus*: Diss. Moscow; 2019.
- Афонина Н.М., Михеева И.В., Михеева М.А. Ветряная оспа в медицинских организациях Москвы. В кн.: *Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XV Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского*. М.; 2023. Afonina N.M., Mikheeva I.V., Mikheeva M.A. Chicken pox in medical organizations in Moscow. In: *Infectious Diseases in the Modern World: Evolution, Current and Future Threats: Proceedings of the XV Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases named after Academician V.I. Pokrovsky*. Moscow; 2023. EDN: <https://elibrary.ru/ovaftrv>
- Национальное научное общество инфекционистов. Клинические рекомендации «Ветряная оспа у взрослых»; 2014.
- Koshy E., Mengting L., Kumar H., Jianbo W. Epidemiology, treatment and prevention of herpes zoster: A comprehensive review. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*. 2018;84(3):251–62. DOI: https://doi.org/10.4103/ijdv.IJDVL_1021_16
- Ермоленко М.В. Серологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за ветряной оспой: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2014. Ermolenko M.V. *Serological monitoring in the system of epidemiological surveillance of chickenpox*: Diss. Moscow; 2014.
- Biskupska M., Małeczka I., Stryczyńska-Kazubska J., Wysoccki J. Varicella — a potential threat to maternal and fetal health. *Ginekol. Pol*. 2017;88(1):13–9. DOI: <https://doi.org/10.5603/gp.a2017.0003>

Information about the authors

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

Irina V. Mikheeva — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, irina_mikheeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8736-4007>

Marina I. Korabelnikova — researcher, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2575-8569>

Zinaida S. Rodionova — researcher, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0401-279X>

Artem V. Snitsar — deputy chief physician, City Clinical Hospital named after V.P. Demikhov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6053-4651>

Sergey N. Perekhodov — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of hospital surgery, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6192-2581>

Svetlana V. Smetanina — Cand. Sci. (Med.), Chief doctor, City Clinical Hospital named after V.P. Demikhov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3763-697X>

Alexey V. Tutelyan — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory for healthcare-related infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

Stanislav N. Kuzin — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Viral hepatitis laboratory, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Author contribution: *Afonina N.M.* — collection and processing of material, statistical processing, writing the text; *Korabelnikova M.I., Rodionova Z.S., Snitsar A.V., Perekhodov S.N., Smetanina S.V.* — organization of the collection and processing of clinical material; *Mikheeva I.V., Akimkin V.G.* — concept and design of the study, editing; *Kuzin S.N., Tutelyan A.V.* — material processing, statistical processing. 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 17.08.2023;
accepted for publication 10.10.2023;
published 28.12.2023

Информация об авторах

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

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

Корабельникова Марина Игоревна — н.с. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2575-8569>

Родионова Зинаида Сергеевна — н.с. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0401-279X>

Сницарь Артем Владимирович — зам. главного врача по медицинской части ГКБ им. В.П. Демихова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6053-4651>

Переходов Сергей Николаевич — д.м.н., профессор, зав. каф. госпитальной хирургии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6192-2581>

Сметанина Светлана Васильевна — к.м.н., главный врач ГКБ им. В.П. Демихова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3763-697X>

Тутельян Алексей Викторович — д.м.н., член-корреспондент РАН, рук. лаб. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2706-6689>

Кузин Станислав Николаевич — д.м.н., профессор, зав. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Вклад авторов: *Афонина Н.М.* — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; *Корабельникова М.И., Родионова З.С., Сницарь А.В., Переходов С.Н., Сметанина С.В.* — организация сбора и обработки клинического материала; *Михеева И.В., Акимкин В.Г.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Кузин С.Н., Тутельян А.В.* — обработка материала, статистическая обработка. 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 17.08.2023;
принята к публикации 10.10.2023;
опубликована 28.12.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-437>

Molecular markers of acute intestinal infections in HIV-infected patients in the Chechen Republic

Khamzat Kh. Murtazaliev¹, Maria A. Makarova^{2,3}, Lidiya A. Kaftyreva^{2,3},
Elena V. Alieva⁴, Aza V. Oshaeva¹, Marina Kh. Zhamborova^{2,3}

¹Republican Clinical Center for Infectious Diseases, Grozny, Russia;

²Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia;

⁴Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. Diarrheal syndrome is the most characteristic symptom of HIV infection, which occurs in 70% of patients and is often fatal. The severity of diarrheal syndrome, irrespective of immune status, is usually determined by specific microorganisms colonising the gastrointestinal tract.

The objective of this study is to assess the prevalence of classical pathogens of acute intestinal infections in diarrheal syndrome in HIV-infected residents of the Chechen Republic (Grozny).

Materials and methods. Stool samples ($n = 191$) of HIV-infected patients with a history of diarrheal syndrome were studied by real-time PCR with two kits of reagents: "AmpliSens OKI screen-FL" for the detection of DNA/RNA of *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Norovirus* and *Astrovirus*; "AmpliSens Escherichiosis-FL" for the detection of diarrheagenic *E. coli* (DEC) DNA of five pathogroups: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EAgEC.

Results. Genetic markers of the acute intestinal infection pathogens were detected in 20.9% of the examined individuals. In patients aged 0–7 years and 18–24 years, DNA/RNA of the tested pathogens were not detected. DNA of bacterial pathogens accounted for 93.9%, RNA of viral pathogens — 6.1%. The etiological structure of bacterial infections was represented by a significant predominance of DEC (84.8%) compared to 10.9% of *Campylobacter* spp. and 4.4% of *Salmonella* spp. The structure of viral infections included 66.7% *Rotavirus* and 33.3% *Norovirus*. Genetic markers of *Adenovirus* and *Astrovirus* have not been identified. In 77.5% of HIV-infected patients, diarrheal syndrome was caused by one pathogen (mono-infection), but in nine examined patients (22.5%) it had a combined etiology.

Conclusion. The etiology of acute intestinal infections in HIV-infected patients of the Chechen Republic includes bacterial and viral pathogens, in every fifth the cause of diarrheal disease was DEC. Due to diarrhea in HIV-infected people being a polyetiological disease, it is necessary to introduce a comprehensive, fast, reliable, and affordable method for identifying a wide range of pathogens that cause secondary infections.

Keywords: HIV, HIV-infection, diarrhea, acute intestinal infections, genetic markers (determinants)

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Saint-Peterburg Pasteur Institute (protocol No.81, November 22, 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: Murtazaliev Kh.Kh., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Alieva E.V., Oshaeva A.V., Zhamborova M.Kh. Molecular markers of acute intestinal infections in HIV-infected patients in the Chechen Republic. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):420–427.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-437>

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

Генетические маркеры возбудителей острых кишечных инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов в Чеченской Республике

Муртазалиев Х.Х.¹, Макарова М.А.^{2,3✉}, Кафтырева Л.А.^{2,3}, Алиева Е.В.⁴,
Ошаева А.В.¹, Жамборова М.Х.²

¹Республиканский клинический центр инфекционных болезней, Грозный, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

³Северо-Западная медицинская академия имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

Аннотация

Актуальность. Диарейный синдром — наиболее характерное проявление ВИЧ-инфекции, который наблюдается у 70% больных и часто становится причиной летального исхода. Степень выраженности диарейного синдрома, независимо от иммунного статуса, как правило, обусловлена конкретными микроорганизмами, колонизирующими желудочно-кишечный тракт.

Цель — изучить распространённость классических возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ) при диарейном синдроме у ВИЧ-инфицированных жителей Чеченской Республики (г. Грозный).

Материалы и методы. Пробы испражнений ($n = 191$) ВИЧ-инфицированных пациентов с диарейным синдромом в анамнезе изучали методом ПЦР в реальном времени с двумя наборами реагентов: «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» для выявления ДНК/РНК микроорганизмов *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Norovirus* и *Astrovirus*; «АмплиСенс Эшерихиозы-FL» для выявления ДНК диареегенных *Escherichia coli* (DEC) патогрупп EPEC, EHEC, ETEC, EIEC и EAgEC.

Результаты. Генетические маркеры возбудителей ОКИ были выявлены у 21,9% обследованных лиц. У пациентов возрастных групп 0–7 и 18–24 лет ДНК/РНК искомым возбудителей не были обнаружены. На долю ДНК бактериальных патогенов приходилось 93,9%, РНК вирусных патогенов — 6,1%. Этиологическая структура бактериальных ОКИ была представлена значимым преобладанием DEC (84,8%) по сравнению с 10,9% *Campylobacter* spp. и 4,4% *Salmonella* spp. Структура вирусных ОКИ включала 66,7% *Rotavirus* и 33,3% *Norovirus*. Генетические маркеры *Adenovirus* и *Astrovirus* не выявлены. У 77,5% ВИЧ-инфицированных диарейный синдром был обусловлен одним возбудителем ОКИ (моноинфекция) у 9 (22,5%) обследованных — сочетанной этиологией.

Заключение. Этиология ОКИ у ВИЧ-инфицированных пациентов Чеченской Республики включает бактериальные и вирусные возбудители, у каждого пятого причиной диарейного заболевания являлись DEC. Учитывая тот факт, что диарея ВИЧ-инфицированных — это полиэтиологическое заболевание, необходимо внедрять комплексный, быстрый, надёжный и доступный метод идентификации широкого спектра возбудителей, вызывающих вторичные инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ, ВИЧ-инфекция, диарея, острые кишечные инфекции, генетические маркеры (детерминанты)

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 81 от 22.11.2022).

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: Муртазалиев Х.Х., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Алиева Е.В., Ошаева А.В., Жамборова М.Х. Генетические маркеры возбудителей острых кишечных инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов в Чеченской Республике. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):420–427.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-437>

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

Introduction

HIV infection is a problem of great importance all over the world, including Russia, due to its pandemic prevalence and increasing rates of morbidity [1, 2]. This nosology is one of the causes of death in young patients and is therefore considered a global threat to mankind and its socio-economic progress [3]. In Russia, due to the increasing number of HIV-infected people, there is an increase in the number of opportunistic diseases and fatal cases due to secondary diseases [4].

The gastrointestinal tract (GIT) is one of the target organs of HIV infection and is involved in the pathological process at different stages of the disease [5]. HIV causes leukocytic infiltration in the mucosa, degenerative changes in intestinal crypts and atrophy of microvilli, which leads to impaired intestinal digestion and absorption, decreased intestinal colonisation resistance, dysbiosis and an infectious process prone to persistence and recurrence. As disease symptoms and morphofunctional changes in the intestinal mucosa progress, HIV-infected individuals often experience diarrhea and intestinal infections, which are a key cause of morbidity and mortality at later stages, regardless of antiretroviral therapy [6]. Diarrheal syndrome (DS) is the most characteristic symptom of HIV infection, which occurs in 70% of patients and is often fatal. In developing countries, more than 90% of HIV-infected people have DS, while in industrialized countries it is present in 50-60% of the infected. The World Health Organization's baseline scenario for 2030 assumes that mortality from HIV/AIDS and diarrheal diseases in developing countries will remain at about 1.7/1.5 million. There are many causes of DS in HIV-infected people, the most common being direct exposure to the viruses, opportunistic pathogens, long-term drug use and/or GIT tumours [7].

Any pathogen that infects immunocompetent individuals is also capable of causing disease in HIV-infected individuals. The severity of DS, regardless of immune status, usually depends on the specific microorganisms colonising the GIT. However, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* and *Rotavirus* can cause particularly severe or prolonged diseases during HIV infection. According to several researchers, HIV-infected adults have 10 times higher rates of bacterial intestinal infections than the HIV-negative population. HIV-infected individuals are at a 20-100-fold increased risk of salmonellosis, associated with bacteraemia in more than 40% of cases, and the mortality rate is increased 7-fold. The average incidence of campylobacteriosis among AIDS patients is 40 times higher than in individuals not infected with HIV [8-10].

Existing data on the incidence of acute intestinal infections among immunocompromised patients are scarce, resulting in a lack of clear and definite knowledge about the etiology of HIV-infected people with

DS. **The aim** of this study was to investigate the prevalence of classical pathogens of acute intestinal infections in HIV-infected residents of the Chechen Republic (Grozny).

Materials and methods

Fecal samples from 191 patients (124 women and 67 men) registered at the Republican AIDS Centre with a history of DS were examined at the Republican Clinical Centre for Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Chechen Republic. The composition of the age groups of patients was as follows: 1-7 years — 1 (0.5%) patient, 18-24 years — 4 (2.1%), 25-34 years — 10 (5.2%), 35-44 years — 58 (30.4%), 45-54 years — 68 (35.6%), over 55 years — 50 (26.2%) The cohort group was formed by random sampling. All patients were informed about participation in the study and gave their voluntary consent. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Saint-Peterburg Pasteur Institute (protocol No.81, November 22, 2022).

The polymerase chain reaction (PCR) method with hybridisation-fluorescence detection was used, using the DT PRIME 5 thermocycler (DNA-Technology) and two reagent kits: AmpliSens OKI screen-FL (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor) for detection and differentiation of DNA (RNA) of microorganisms of the *Shigella spp./EIEC*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* (thermophilic), *Adenovirus* (group F/grF), *Rotavirus* (group A/grA), *Norovirus* (2nd genotype/G II) and *Astrovirus* genera; AmpliSens Escherichiosis-FL (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor) for detection of diarrheagenic *E. coli* (DEC) pathogroups EPEC, EHEC, ETEC, EIEC and EAgrEC. Results were interpreted based on the fluorescence signal levels of the respective HEX, FAM or ROX channels. The identification of the strains belonging to the EPEC, ETEC, EIEC, EAgrEC pathogroups was performed according to the manufacturer's instructions and methodological guidelines. Strains showing fluorescence levels above the threshold for HEX channel in PCR mix-1 were considered as shigatoxin-producing (STEC); strains showing fluorescence levels above the threshold for HEX channel in PCR mix-1 and PCR mix-2 were considered as enterohaemorrhagic (EHEC).

The obtained data were processed using Microsoft Office Excel. Fisher's exact test was used to assess the statistical significance of differences in mean values. Differences with a confidence interval of 95% ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

Results

Molecular markers of the investigated pathogens of acute intestinal infections were detected in fecal samples of 40 (20.9%) of the examined patients, including 26 (21.0%) women and 14 (21.0%) men without

significant statistical differences ($p > 0.05$) (**Table 1**). In patients aged 0-7 years and 18-24 years, DNA/RNA of the pathogens were not detected. No significant differences in the frequency of detection of molecular markers of acute intestinal infection pathogens in fecal samples from patients of other age groups were found ($p > 0.05$).

The results of the molecular study are presented in **Table 2**. In 40 positive samples, 49 molecular markers of acute intestinal infection pathogens were detected, of which DNA of bacterial pathogens accounted for 93.9% ($n = 46$) and RNA of viral pathogens for 6.1% ($n = 3$). The differences were statistically significant, $p < 0.05$. The etiological structure of bacterial intestinal infections was represented by a significant pre-

dominance of diarrheagenic *E. coli* 84.8% ($n = 39$) of which: EPEC — 48.7% ($n = 19$), STEC — 20.5% ($n = 8$), EIEC — 17.9% ($n = 7$), EA_gEC — 7.7% ($n = 3$), ETEC — 5.1% ($n = 2$) compared to 10.9% ($n = 5$) thermophilic *Campylobacter spp.* and 4.4% ($n = 2$) *Salmonella spp.* ($p < 0.05$). The viral pattern of acute intestinal infections included 66.7% ($n = 2$) *Rotavirus* (group A) and 33.3% ($n = 1$) genotype 2 *Norovirus*. *Adenovirus grF* and *Astrovirus* molecular markers were not detected.

In 31 (77.5%) HIV-infected patients, DS was caused by a single pathogen of acute intestinal infections (monoinfection), and in 9 (22.5%) — by several. Monoinfection was significantly more often caused by bacterial pathogens: 67.4% compared to viral patho-

Table 1. Detection rates of molecular markers of acute intestinal infections in HIV-infected patients with diarrheal syndrome of different age in the Chechen Republic

Characteristic of examined persons	Number of samples	Positive for molecular markers		CI
		<i>n</i>	%	
0–17 years old	1	0	0	0–0,8
18–24 years old	4	0	0	0–0,5
25–34 years old	10	2	20,0	5,7–51,0
35–44 years old	58	12	20,7	12,3–32,8
45–54 years old	68	18	26,5	17,5–38,0
55 years and older	50	8	16,0	8,3–28,5
Women	124	26	21,0	14,73–28,95
Men	67	14	21,0	12,9–32,1
Total	191	40	20,9	15,8–27,3

Table 2. Detection rates of DNA/RNA of causative agents of acute intestinal infections in HIV-infected residents of the Chechen Republic

Pathogen	Total		Monoinfection		Combined infections	
	<i>n</i> (%)	95% CI	<i>n</i> (%)	95% CI	<i>n</i> (%)	95% CI
Bacterial						
<i>Campylobacter spp.</i>	5 (10,9)	4,7–23,0	2 (6,5)	1,8–20,7	3 (20,0)	7,1–45,2
<i>Salmonella spp.</i>	2 (4,4)	1,2–14,5	2 (6,5)	1,8–20,8	0 (0)	0–20,4
Diarrheagenic <i>E. coli</i> , including:	39 (84,8)	71,8–92,4	27 (87,1)	71,2–94,9	12 (80,0)	54,8–92,9
EA _g EC	3 (7,7)	2,6–20,3	2 (7,4)	2,1–23,4	1 (8,3)	1,5–35,4
EIEC	7 (17,9)	9,0–32,7	4 (14,8)	5,9–32,5	3 (25,0)	8,9–53,2
ETEC	2 (5,1)	1,4–16,9	1 (3,7)	0,7–18,3	1 (8,3)	1,5–35,4
EPEC	19 (48,7)	33,9–63,8	14 (51,8)	33,9–69,3	5 (41,7)	19,3–68,1
STEC	8 (20,5)	10,8–35,3	6 (22,2)	10,6–40,7	2 (16,7)	4,7–44,8
Total bacterial	46 (93,9)	83,5–97,9	31 (67,4)	52,9–79,1	15 (32,6)	20,9–47,0
Viral						
<i>Norovirus</i> GII	1 (33,3)	6,2–79,2	0 (0)	0–65,8	1 (100)	20,7–100
<i>Rotavirus</i> grA	2 (66,6)	20,8–93,9	1 (50,0)	9,5–90,6	1 (50,0)	9,5–90,6
Total viral	3 (6,1)	2,1–16,5	1 (2,0)	0,4–12,2	2 (4,1)	1,1–13,7
Total	49 (100)	92,7–100	32 (65,30)	51,3–77,1	17 (34,7)	22,9–49,7

gens — 2.0 ($p < 0.05$). Analysis of co-infection cases showed a prevalence of bacterial (77.8%) compared to viral-bacterial coinfections (22.2%; **Table 3**). DEC genetic determinants were present in all cases of co-infections of acute intestinal infections.

When analysing the distribution of the examined individuals by sex and age, significant differences were revealed (**Figure**). The main pathogens of acute intestinal infections in HIV-infected men and women were DEC. Thermophilic *Campylobacter spp.* were identified only in women; no significant differences were found with regard to other studied acute intestinal infection pathogens of bacterial and viral etiology. Bacterial pathogens were identified in all age groups, viral pathogens — only in the groups of 25–34 and 35–44

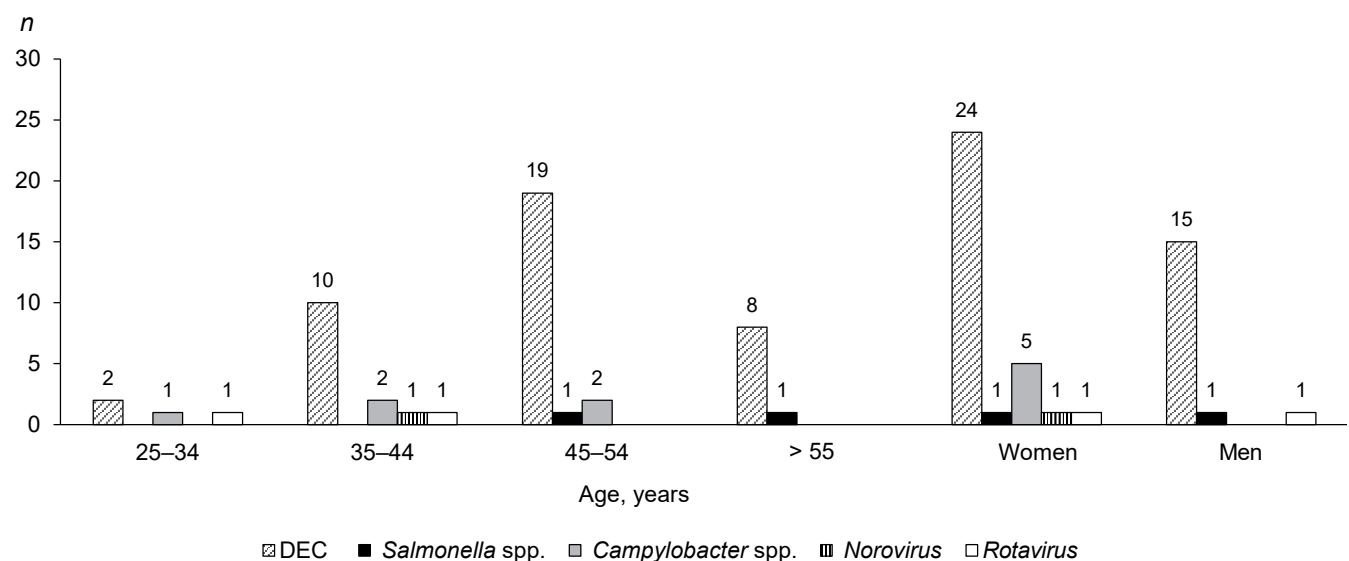
year olds. In the age group of 25–34 years, diarrheal syndrome was caused by bacterial and viral etiology without dominance of a particular pathogen. In the age groups 35–44, 45–54 years and 55 years and older, DEC was a significantly more frequent pathogen of acute intestinal infection ($p < 0.05$), other bacterial and viral infections were detected without significant differences ($p > 0.05$).

Discussion

Infectious diarrheal diseases are an urgent problem of HIV-infected people in the Chechen Republic. The overall rate of intestinal infections was 20.94 %. There were no statistical differences by sex among the HIV-infected population of the Republic. Patients

Table 3. Characteristics of acute intestinal infections of combined etiology in HIV-infected patients in the Chechen Republic

Etiological agent	Number of cases			
	<i>n</i>	%	95% CI	<i>p</i>
Bacterial				
<i>Campylobacter spp.</i> + EPEC	1	11,1	2,0–43,5	> 0,05
<i>Campylobacter spp.</i> + STEC	1	11,1	2,0–43,5	> 0,05
EPEC + EIEC	1	11,1	2,0–43,5	> 0,05
EPEC + EAgEC	1	11,1	2,0–43,5	> 0,05
EPEC + ETEC	1	11,1	2,0–43,5	> 0,05
STEC + EIEC	1	11,1	1,99–43,5	> 0,05
Total bacterial-bacterial	7	77,8	45,3–93,7	< 0,05
Viral-bacterial				
Rotavirus grA + EIEC	1	11,1	2,0–43,5	> 0,05
Norovirus GII + <i>Campylobacter spp.</i> + EPEC	1	11,1	2,0–43,5	> 0,05
Total viral-bacterial	2	22,2	6,3–41,7	> 0,05
Total combined infections	9	100,0	70,1–100	



Distribution by sex and age of HIV-infected patients with diarrheal syndrome in the Chechen Republic.

aged 0–7 and 18–24 years had statistically significantly lower presence of molecular markers of classical acute intestinal infection pathogens, which may be associated with timely prescription and higher adherence to treatment with of antiretroviral and prophylactic antimicrobial drugs in these patients, which contributes to the inhibition of potential intestinal pathogens [11, 12].

The main causative agents of diarrheal diseases, not only bacterial, but also in the etiological structure of acute intestinal infections, were DEC (84.8%), most of which were represented by anthroponotic pathogens (74.4%): EPEC (48.7%), EIEC (17.9%) and EAEC (7.7%). The results confirm that DEC are the most common microorganisms associated with diarrhea in HIV infection. The most frequent pathogroup was EPEC, which are common in HIV with diarrheal syndrome [13, 14]. Molecular markers of pathogens commonly transmitted with food: *Salmonella*, *Campylobacter* and STEC were detected in 4.4%, 10.9% and 25.5% of cases respectively [15]. Studies conducted in Austria, the Netherlands and Germany have also shown that these bacterial pathogens account for the smallest number of cases of acute gastroenteritis in HIV-infected people [16].

Rotavirus group A was detected only in 2 adult patients, although according to V.P. Bondarev et al. this pathogen is the most frequent cause of severe gastroenteritis in children in many countries, accounting for 30–72% of hospitalised patients and 4–24% of patients with mild acute gastroenteritis not requiring hospitalisation [17]. According to the data of Form 2 "Information on infectious and parasitic diseases" for 2019–2022 and the State Report "On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2022", cases of rotavirus infection were not registered in the Republic of Ingushetia and the Chechen Republic. The absence of reported incidence may be associated with insufficient implementation of molecular biological methods in the laboratory diagnosis of acute intestinal infections. At the same time, the absence of *Rotavirus* in this study may be due to the absence of infants and young children in the study group, as well as the fact that the studies were conducted in the spring and summer period. *Adenovirus* and *Astrovirus* were not detected in our study, although according to L. Seid et al. they are considered potential opportunistic pathogens [18].

In 31 (77.5%) fecal samples, molecular markers of a single acute intestinal infection pathogen were detected, and according to the results of laboratory testing, DS was identified as a monoinfection. Samples from 9 (22.5%) examined patients contained a mixture of enteropathogens (combined acute intestinal infections): in 8 (20.0%) samples markers of two acute intestinal infection pathogens were detected, in one sample (2.5%) three pathogens were identified. A high prevalence of co-infections (25–53%) has been described among HIV-infected people in developing countries [14, 19].

DEC predominated in all co-infections, which is consistent with previous data [20].

In the era of effective antiretroviral therapy, the clinical picture of DEC in people living with HIV may not be comparable to their classic symptoms. The use of a comprehensive multiplex format in the laboratory diagnosis of DS in HIV-infected people is the only highly sensitive method that allows the establishment of the etiology of acute intestinal infections not only in the acute period of the disease, but also in asymptomatic carriers. A large-scale study conducted in Ethiopia using modern laboratory diagnostic methods showed that 56.3% of DS cases in HIV-infected people was caused by pathogens of bacterial, viral and/or parasitic etiology, and notably, it allowed the identification of co-infections in 35% of cases [14, 18, 21].

Conclusion

The etiology of acute intestinal infection pathogens in HIV-infected patients in the Chechen Republic includes bacterial and viral pathogens. The study showed that almost every fifth HIV-infected person was caused by DEC, which confirmed their relevance in the structure of acute intestinal infections. Laboratory diagnosis of these pathogens is possible only using molecular genetic methods. To reduce the burden of diarrheal diseases in HIV-infected people in the Chechen Republic, it is necessary to conduct targeted epidemiological and microbiological studies to identify DEC, to study the contamination of environmental objects, including water and food, and to identify risk factors. Given that DS in HIV-infected people is a polyetiological disease, it is necessary to introduce a comprehensive, rapid, reliable and available method of identifying a wide range of pathogens causing secondary diseases.

It is important to note that this is the first study conducted in the Chechen Republic, and the results obtained can be used to develop protocols for the prevention and treatment of DS in HIV-infected people at the regional and republican levels.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Радзиховская М.В., Москвичева М.Г., Брылина Н.Ю. Глобальные тенденции в развитии распространения ВИЧ-инфекции. *Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области*. 2018;2(2):3–12. Radzikhovskaya M.V., Moskvicheva M.G., Brylina N.Y. Global trends in the development of HIV infection. *Bulletin of the Council of Young Scientists and Specialists of the Chelyabinsk Region*. 2018;2(2):3–12. EDN: <https://elibrary.ru/xohqdb>
2. Афтаева Л.Н., Мельников В.Л., Вотолкина С.В. и др. Особенности ВИЧ-инфекции у взрослых. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020;40(4):86–90. Aftaeva L.N., Mel'nikov V.L., Votolkina S.V., et al. Features of HIV infection in adults. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2020;40(4):86–90. DOI: <https://doi.org/10.15372/SSMJ20200412> EDN: <https://elibrary.ru/cbyvae>
3. Хаирова Я.Р., Скорodelова М.И., Никольская М.В. Оппортунистические инфекции при ВИЧ-инфекции. *Вестник*

- Пензенского государственного университета. 2021;(2): 69–72. Khairova Ya.R., Skorodelova M.I., Nikolskaya M.V. Opportunistic infections in HIV infection. *Vestnik of Penza State University*. 2021;(2):69–72.
EDN: <https://elibrary.ru/dlpqve>
4. Покровская А.В., Самотолкина Е.А., Матосова С.В. и др. Клинико-лабораторные особенности и прогностические факторы исхода прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии у ВИЧ-инфицированных пациентов. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023;15(1):50–9. Pokrovskaya A.V., Samotolkina E.A., Matosova S.V., et al. Clinical and laboratory features and prognostic factors for outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-infected patients. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2023;15(1):50–9.
DOI: <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-1-50-59>
EDN: <https://elibrary.ru/xcrmmе>
 5. Al Anazi A.R. Gastrointestinal opportunistic infections in human immunodeficiency virus disease. *Saudi J. Gastroenterol*. 2009;15(2):95–9.
DOI: <https://doi.org/10.4103/1319-3767.48965>
 6. Хасанова Г.М., Урунова Д.М., Ахмеджанова З.И. и др. Поражение желудочно-кишечного тракта при ВИЧ-инфекции. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2019;(3):24–8. Khasanova G.M., Urunova D.M., Akhmedzhanova Z.I., et al. Defeat of the gastrointestinal tract in HIV infection. *Pacific Medical Journal*. 2019;(3):24–8.
DOI: <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2019.3.24-28>
EDN: <https://elibrary.ru/agdtdy>
 7. Hall V.P. Common gastrointestinal complications associated with human immunodeficiency virus/AIDS: An overview. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am*. 2018;30(1):101–7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.10.009>
 8. Тимченко В.Н., Архипова Ю.А. Поражение желудочно-кишечного тракта при ВИЧ-инфекции у детей. *Детские инфекции*. 2010;9(3):22–6. Timchenko V.N., Arkhipova Yu.A. Gastrointestinal manifestations of pediatric HIV-infection. *Children Infections*. 2010;9(3):22–6.
EDN: <https://elibrary.ru/musaep>
 9. Shah S., Kongre V., Kumar V., Bharadwaj R. A study of parasitic and bacterial pathogens associated with diarrhea in HIV-positive patients. *Cureus*. 2016;8(9):e807.
DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.807>
 10. Belay A., Ashagrie M., Seyoum B., et al. Prevalence of enteric pathogens, intestinal parasites and resistance profile of bacterial isolates among HIV infected and non-infected diarrheic patients in Dessie Town, Northeast Ethiopia. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243479.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243479>
 11. Carlucci J.G., Liu Y., Clouse K., Vermund S.H. Attrition of HIV-positive children from HIV services in low and middle-income countries. *AIDS*. 2019;33(15):2375–86.
DOI: <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002366>
 12. Adetokunboh O.O., Uthman O.A., Wiysonge C.S. Non-specific effects of childhood vaccines on acute childhood morbidity among HIV-exposed children in sub-Saharan Africa: a multilevel analysis. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2018;14(10):2382–90.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1516490>
 13. Basile F.W., Fedele M.C., Lo Vecchio A. Gastrointestinal diseases in children living with HIV. *Microorganisms*. 2021;9(8):1572.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081572>
 14. Montalvo-Otivo R., Vilcapoma P., Murillo A., et al. Evaluation of chronic diarrhea in patients newly diagnosed with HIV infection through the FilmArray® gastrointestinal panel. *Rev. Gastroenterol. Mex. (Engl. Ed.)*. 2023.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rgmxe.2023.02.002>
 15. Feasey N.A., Healey P., Gordon M.A. Review article: the aetiology, investigation and management of diarrhoea in the HIV-positive patient. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2011;34(6):587–603.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04781.x>
 16. Newman K.L., Newman G.S., Cybulski R.J., Fang F.C. Gastroenteritis in men who have sex with men in Seattle, Washington, 2017–2018. *Clin. Infect. Dis*. 2020;71(1):109–15.
DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz783>
 17. Бондарев В.П., Шевцов В.А., Индикова И.Н. и др. Эпидемиология ротавирусной инфекции и тактика вакцинопрофилактики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(2):81–7. Bondarev V.P., Shevtsov V.A., Indikova I.N., et al. Rotavirus Epidemiology and Vaccination Tactics. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(2):81–7.
DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-81-87>
EDN: <https://elibrary.ru/wgiruv>
 18. Seid L., Stokes W., Bayih A.G., et al. Molecular detection of Enteropathogens from diarrheic stool of HIV positive patients in Gondar, Ethiopia. *BMC Infect. Dis*. 2018;18(1):354.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3265-8>
 19. Bejide O.S., Odebode M.A., Ogunbosi B.O., et al. Diarrhoeal pathogens in the stools of children living with HIV in Ibadan, Nigeria. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2023;13:1108923.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1108923>
 20. Masiga F., Kigozi E., Najjuka C.F., et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children with acute diarrhoea at Rakai hospital, Southern Uganda. *Afr. Health Sci*. 2022;22(1):581–8.
DOI: <https://doi.org/10.4314/ahs.v22i1.67>
 21. Ayele A.A., Tadesse D., Manilal A., et al. Prevalence of enteric bacteria and enteroparasites in human immunodeficiency virus-infected individuals with diarrhoea attending antiretroviral treatment clinic, Arba Minch General Hospital, southern Ethiopia. *New Microbes New Infect*. 2020;38:100789.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100789>

Information about the authors

Khamzat Kh. Murtazaliev — Chief freelance specialist, Ministry of Health of the Chechen Republic on the problems of diagnosing and treating HIV infection; chief physician, Republican Clinical Center for Infectious Diseases, Grozny, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-4524-5730>

Maria A. Makarova[✉] — D. Sci. (Med), senior researcher, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; assistant professor, Department of medical microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, makmaria@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Lidiya A. Kaftyreva — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; assistant professor, Department of medical microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0989-1404>

Elena V. Alieva — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of clinical laboratory diagnostics with a course of bacteriology, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0009-0007-1349-9882>

Aza V. Oshaeva — chief freelance specialist in medical microbiology, Ministry of Health of the Chechen Republic, Grozny, Russia; Head, Bacteriological laboratory, Republican Clinical Center for Infectious Diseases, Grozny, Russia, <https://orcid.org/0009-0002-0771-755X>

Marina Kh. Zhamborova — laboratory researcher, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0009-9620-9784>

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 28.08.2023;
accepted for publication 10.11.2023;
published 28.12.2023

Информация об авторах

Муртазалиев Хамзат Хусейнович — главный внештатный специалист Министерства здравоохранения Чеченской Республики по проблемам диагностики и лечения ВИЧ-инфекции, Грозный, Россия; главный врач Республиканского клинического центра инфекционных болезней, Грозный, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-4524-5730>

Макарова Мария Александровна[✉] — д.м.н., в.н.с. лаб. кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент каф. медицинской микробиологии Северо-Западной медицинской академии им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, makmaria@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Кафтырева Лидия Алексеевна — д.м.н., зав. лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор каф. медицинской микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0989-1404>

Алиева Елена Васильевна — д.м.н., доцент, профессор каф. клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии Ставропольского государственного медицинского университета, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0009-0007-1349-9882>

Ошаева Аза Вахаевна — главный внештатный специалист по медицинской микробиологии министерства здравоохранения Чеченской Республики, Грозный, Россия; зав. бактериологической лабораторией Республиканского клинического центра инфекционных болезней, Грозный, Россия, <https://orcid.org/0009-0002-0771-755X>

Жамборова Марина Хасанбиевна — лаборант-исследователь лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0009-9620-9784>

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 28.08.2023;
принята к публикации 10.11.2023;
опубликована 28.12.2023

Оригинальная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-449>

Генетическая структура и лекарственная устойчивость популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Кемеровской области — Кузбассе

Лебедева И.Б.^{1✉}, Жданова С.Н.², Кондратов И.Г.², Сибиль К.В.³,
Огарков О.Б.², Брусина Е.Б.¹

¹Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия;

²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия;

³Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр им. И.Ф. Копыловой, Кемерово, Россия

Аннотация

Введение. В Кемеровской области — Кузбассе сохраняется сложная эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу (ТБ) с уровнями заболеваемости, превышающими среднероссийский уровень. Эпидемиологический процесс ТБ в значительной степени определяется циркулирующими вариантами *Mycobacterium tuberculosis*. Скрининг эпидемиологически значимых вариантов возбудителя на территориях с высоким бременем ТБ лежит в основе эпидемиологической диагностики и необходим для разработки эффективных мер профилактики, однако популяционная структура *M. tuberculosis* в Кемеровской области — Кузбассе мало изучена.

Цель исследования: изучить генетический полиморфизм и фенотипическую устойчивость к противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis* в Кемеровской области — Кузбассе.

Материалы и методы. Проведено MIRU-VNTR-генотипирование 163 изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от больных ТБ жителей Кемеровской области в марте–октябре 2022 г. Культивирование *M. tuberculosis*, определение лекарственной чувствительности, выделение геномной ДНК осуществляли стандартными методами. Генотипическую идентификацию проводили с помощью 24 локусного MIRU-VNTR-типирования. Параллельно проведено экспресс-генотипирование: выявление изолятов генотипа Beijing (по RD105/207) и non-Beijing; субтипирование Beijing в полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на выявление Central Asian Russian и B0/W148; идентификацию группы non-Beijing — ПЦР-РВ-тестами на LAM, S, Ural.

Результаты. Установлено доминирование изолятов группы Beijing (67,5%) как среди впервые выявленных (64,4%), так и среди ранее леченных больных ТБ (88,5%). MIRU-VNTR-типирование обнаружило 75 профилей, из них 94-32 (35,3%) и 100-32 (15,7%) были самыми многочисленными и принадлежали генотипу Beijing. В целом 39,9 и 20,9% изолятов отнесено к эпидемиологическим кластерам Beijing Central Asian Russian и B0/W148 соответственно, которые значимо отличались по уровням множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) — 50,8 и 85,3% соответственно ($p = 0,005$). Вторыми по распространенности были штаммы генетического семейства евро-американской линии (31,9%): LAM (6,7%), Ural (7,4%), Haarlem (4,9%) и L4-unclassified (12,9%). МЛУ среди этих минорных генотипов была значительно ниже, чем среди Beijing, и составляла 11,5% ($p < 0,001$). Штаммы от больных ТБ с ВИЧ-инфекцией (56,4% общей выборки) чаще имели МЛУ-профиль (54,8%), чем в случаях ТБ без ВИЧ-инфекции (35,2%; $p = 0,005$), что может быть связано с более высокими уровнями Beijing в группе больных ТБ с ВИЧ-инфекцией (75,0% против 57,7%; $p = 0,026$). Показана полная сопоставимость разработанных нами тестов однонуклеотидного полиморфизма для выявления основных генотипов и эпидемиологически значимых субтипов Beijing, позволивших охарактеризовать 75,5% выборки экспресс-методом.

Заключение. Молекулярно-генетический скрининг в Кемеровской области выявил гетерогенность популяции *M. tuberculosis*, в которой доминировали штаммы генотипа Beijing, по частоте субтипов, сравнимой с другими территориями Сибирского федерального округа.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, молекулярная эпидемиология, генотипы, лекарственная устойчивость

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Кемеровского государственного медицинского университета (протокол № 255/к от 11.11.2020) и Этическим комитетом Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (протокол № 4 от 12.04.2023).

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-15-00280).

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

Для цитирования: Лебедева И.Б., Жданова С.Н., Кондратов И.Г., Сибиль К.В., Огарков О.Б., Брусина Е.Б. Генетическая структура и лекарственная устойчивость популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Кемеровской области — Кузбассе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):428–441.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-449>
EDN: <https://www.elibrary.ru/uwbzwm>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-449>

Genetic structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Kemerovo Region — Kuzbass

Irina B. Lebedeva¹✉, Svetlana N. Zhdanova², Ilya G. Kondratov²,
Kirill V. Sybil³, Oleg B. Ogarkov², Elena B. Brusina¹

¹Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia;

²Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia;

³Kuzbass Clinical Phthisiopulmonological Medical Center named after I.F. Kopylova, Kemerovo, Russia

Abstract

Background. Kemerovo Region has a high burden of tuberculosis (TB) with incidence rates twice the national average. The circulating variants of *Mycobacterium tuberculosis* significantly influence the TB epidemic process. Screening of epidemically significant variants of the pathogen in areas with a high burden of TB underlies epidemiological diagnosis and is necessary for the development of effective prevention measures. However, the population structure of *M. tuberculosis* in the Kemerovo Region — Kuzbass is poorly understood.

Aims: to study genetic heterogeneity and phenotypic resistance to anti-tuberculosis drugs of *M. tuberculosis* strains in the Kemerovo Region.

Materials and methods. The MIRU-VNTR genotyping of 163 *M. tuberculosis* strains isolated from TB patients in the Kemerovo Region in March–October 2022 was carried out. Cultivation of *M. tuberculosis*, drug susceptibility testing, and isolation of genomic DNA were carried out by standard methods. Genotypic identification was performed using MIRU-VNTR (24 loci) typing. In parallel, express genotyping was carried out: identification of isolates of the Beijing genotype (by RD105/207) and non-Beijing; subtyping Beijing using real-time PCR tests for detection of Central Asian Russian and B0/W148; identification of the non-Beijing group by real-time PCR RT tests for LAM, S, Ural.

Results. The isolates of the Beijing genotype (67.5%) were found to dominate both among newly diagnosed (64.4%) and previously treated patients (88.5%). MIRU-VNTR typing revealed 75 profiles, of which 94-32 (35.3%) and 100-32 (15.7%) were the most abundant and belonged to the Beijing genotype. Overall, 39.9% and 20.9% of isolates, respectively, were assigned to the Beijing Central Asian Russian and B0/W148 epidemic clusters, which differed significantly in MDR levels (50.8% and 85.3%, respectively; $p = 0.005$). The second most common were strains of the genetic family of the Euro-American lineage (L4) (31.9%): LAM (6.7%) Ural (7.4%) Haarlem (4.9%) and L4-unclassified (12.9%), MDR among of these minor genotypes was significantly lower than among Beijing genotype strains, and amounted to 11.5% ($p < 0.001$). Strains from HIV-TB patients (56.4% of the total sample) carried an MDR profile more often (54.8%) compared to TB cases without HIV infection (35.2%) ($p = 0.005$), which may be due to higher proportion of Beijing genotype strains in the HIV-TB group (75.0% vs. 57.7%; $p = 0.026$). Complete comparability of the SNP analysis (in-house tests) to identify the main genotypes and epidemically significant Beijing subtypes was shown, which made it possible to characterize 75.5% of the sample by the express method.

Conclusions. The molecular genetic screening carried out in the Kemerovo Region revealed the heterogeneity of the *M. tuberculosis* population, which was dominated by strains of the Beijing genotype, with the frequency of subtypes comparable with other territories of the Siberian Federal District.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, molecular epidemiology, genotypes, drug resistance

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Kemerovo State Medical University (protocol No. 255/к, November 11, 2020) and by the Ethics Committee of the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (protocol No. 4, April 12, 2023).

Funding source. The study was carried out with financial support from a grant from the Russian Science Foundation (project No. 23-15-00280).

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

For citation: Lebedeva I.B., Zhdanova S.N., Kondratov I.G., Sybil K.V., Ogarkov O.B., Brusina E.B. Genetic structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Kemerovo Region — Kuzbass. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):428–441.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-449>
EDN: <https://www.elibrary.ru/uwbzwm>

Введение

Несмотря на то что заболеваемость туберкулезом (ТБ) на территории Кемеровской области — Кузбасса, как и в целом по России, за последние годы снизилась [1], Кузбасс сохраняет позиции региона с высоким бременем этой инфекции [2]. В 2021 г. заболеваемость ТБ составила 70,3 на 100 тыс. населения, что более чем в 2 раза выше среднероссийского уровня (31,1 на 100 тыс. населения).

Среди причин сохранения неблагоприятной эпидемиологической обстановки по ТБ отмечают рост числа случаев ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и распространение сочетанной инфекции ВИЧ и ТБ. Кемеровская область по уровням МЛУ-ТБ и ВИЧ-ТБ входит в группу лидеров не только в Сибирском федеральном округе, но и в России [2]. Распространение МЛУ-ТБ в России связывают с широкой циркуляцией штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) генотипа Beijing, его основных субтипов — Beijing Central Asian Russian (Центральноазиатский российский) и Beijing B0/W148 [3, 4]. В азиатских регионах России

доля генотипа Beijing варьирует от 45 до 70% [5–9]. По Кемеровской области системная информация о популяционной структуре возбудителя ТБ практически отсутствует, поскольку ранее проводимые в Западной Сибири скрининговые исследования МБТ включали лишь небольшое количество штаммов из этого региона [9, 10].

Цель исследования: изучить генетический полиморфизм и фенотипическую устойчивость к противотуберкулезным препаратам (ПТП) штаммов МБТ в Кемеровской области — Кузбассе.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Выполнено MIRU-VNTR-генотипирование МБТ, схема которого представлена на **рис. 1**. Объект исследования — клинические культуры МБТ, полученные от больных ТБ, проживающих в Кемеровской области — Кузбассе и госпитализированных в Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр. Исследуемая кол-

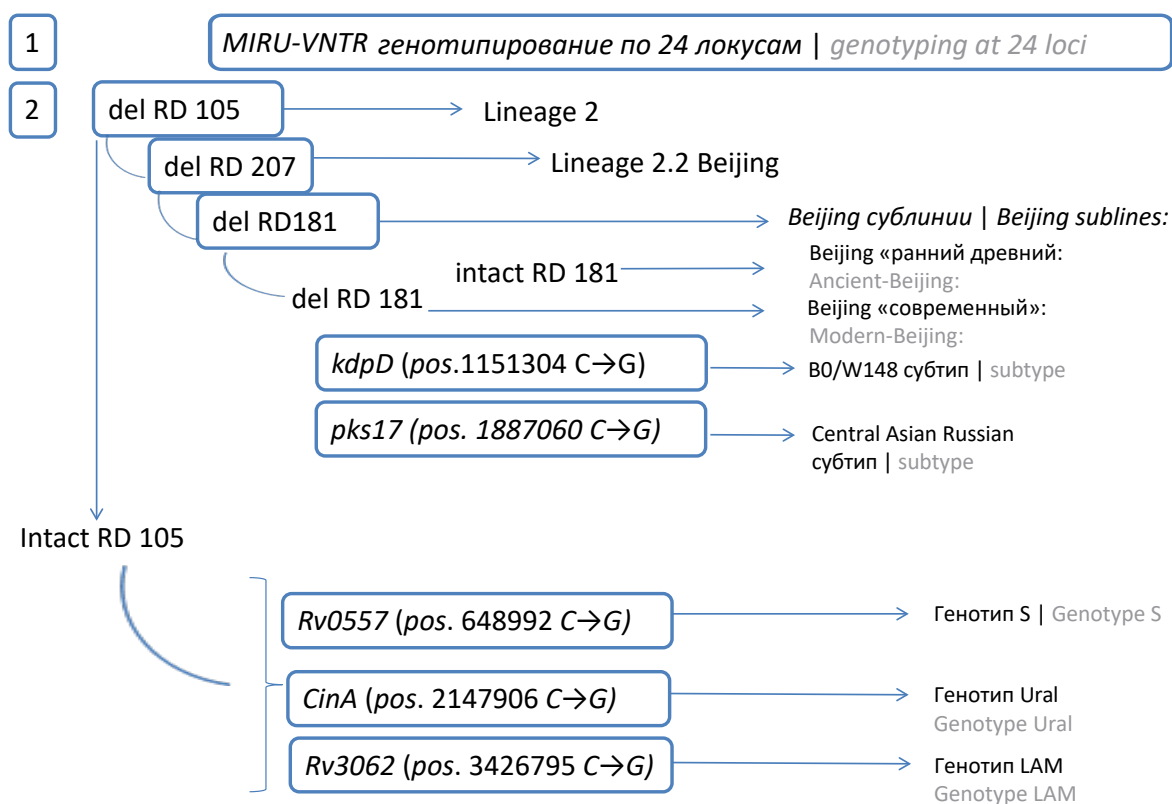


Рис. 1. Схема генотипирования МБТ.

Fig. 1. *M. tuberculosis* genotyping scheme.

лекция включала сплошную выборку образцов (по одному от пациента) клинических культур МБТ со среды Левенштейна–Йенсена, собранных в марте–октябре 2022 г.

Определение лекарственной чувствительности изолятов МБТ к ПТП проводили методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна–Йенсена (в концентрациях для стрептомицина — 10 мкг/мл; изониазида — 1 мкг/мл; рифампицина — 40 мкг/мл; этамбутола — 2 мкг/мл; офлоксацина — 2 мкг/мл; канамицина — 30 мкг/мл; капреомицина — 30 мкг/мл; протионамида — 30 мкг/мл) и модифицированным методом пропорций на жидкой питательной среде Мидделбрука 7Н9 с применением бактериологического анализатора с автоматизированной детекцией роста «Bactec MGIT 960» («Becton Dickinson») (в концентрациях для стрептомицина — 1,0 мкг/мл; изониазида — 0,1 мкг/мл; рифампицина — 0,5 мкг/мл; этамбутола — 5,0 мкг/мл; пиразинамида — 100 мкг/мл; амикацина — 1,0 мкг/мл; капреомицина — 2,5 мкг/мл; бедаквилина — 1,0 мкг/мл; протионамида — 2,5 мкг/мл; левофлоксацина — 1 мкг/мл; моксифлоксацина — 0,25 и 1 мкг/мл; линезолида — 1,0 мкг/мл) согласно Приказу МЗ РФ № 951 от 29.12.2014 и Клиническим рекомендациям «Туберкулез у взрослых, 2022».

Экстракцию ДНК штаммов МБТ проводили из инактивированных кипячением культур МБТ. Перед выделением образцы центрифугировали, ДНК выделяли из осадка набором ДНК-сорб В («Интерлабсервис»). Генотипирование осуществляли по 24 локусам MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units — Variable Number of Tandem Repeats)¹. Идентификацию и классификацию по MLVA MtbC 15-9 полученных по MIRU-VNTR-24-профилей проводили с помощью онлайн-инструментов MIRU-VNTRplus².

Последовательность тестов включала делеционный анализ по RD в реакциях полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией и анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) (рис. 1): RD 105 и RD 207 с на выявление Линии 2, Линии 2.2 (Beijing) и группы non-Beijing согласно Reed [11]; дифференциацию генотипа Beijing на современную и раннедревнюю сублинии путём определения делеции RD181 согласно M.V. Reed [11]; осуществление двух ПЦР-РВ для всех представителей Beijing на выявление специфической динуклеотидной делеции в гене *kdpD*³ и специфического SNP в гене

pks17 [12] для идентификации российского эпидемического субтипа Beijing B0/W148 и Beijing Central Asian Russian субтипа; выполнение трех ПЦР-РВ для всей группы non-Beijing штаммов с целью установления принадлежности к генотипам евро-американской линии (для генотипа S — в *Rv0557* [13, 14]; генотипа LAM в — *Rv3062* [15]; Ural — в гене *CinA* [13]). Праймеры и зонды представлены в табл. 1.

Условия для проведения ПЦР: в течение 45 циклов с реактивами AmpliTaq Gold 360 Master Mix («Applied Biosystems») в присутствии 1× раствора энхансера из того же набора на амплификаторе «CFX-96 Touch» («BioRad»). Режимы ПЦР-РВ: 95°C — 10 мин, активация полимеразы; 95°C — 15 с; отжиг 60–64°C (в зависимости от теста) — 10 с; 72°C — 20 с. При отсутствии маркеров, использованных в SNP-анализе, штаммы считали как «Beijing другие» и «non-Beijing другие». Для сопоставления результатов типирования (MIRU-VNTR-24 и SNP-анализ) профили соотносили по базам данных генотипов Beijing [16], LAM [17], Ural [18], S [19], Lineage 4 [20].

Критерии соответствия

Критериями включения в коллекцию штаммов были деперсонализированные данные о больных ТБ: проживание в Кемеровской области, лечение в противотуберкулезных диспансерах, возраст старше 18 лет.

Критерии исключения: возраст менее 18 лет, отсутствие бактериовыделения.

Этическая экспертиза

Исследование одобрено Этическим комитетом Кемеровского государственного медицинского университета (протокол № 255/к от 11.11.2020) и Этическим комитетом Научного центра здоровья семьи и репродукции человека (протокол № 4 от 12.04.2023). Вся информация об образцах МБТ, использованных в этом ретроспективном исследовании, исключала личную информацию о пациентах.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили в редакторе электронных таблиц «MS Excel 14.0» и в программе «GraphPad Prism 7». После проведения теста на нормальность с помощью теста Шапиро–Уилка количественные показатели представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона [IQR]. Номинальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Критерий χ^2 был использован для обнаружения значимых

¹ URL: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces;jsessionid=89112F274226E781C7B0B0D9118FDD70>

² URL: <http://www.miru-vntrplus.org>

³ Eurasian Patent № 032489. Oligonucleotide primers, fluorescent DNA probes and a method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* clonal complex 2 — W148 of the Beijing genotype

Таблица 1. Структуры праймеров и зондов, разработанные для индикации субтипов генотипа Beijing и генотипов евро-американской линии (LAM, S, Ural)**Table 1.** Primers and probes designed to identify Beijing genotype subtypes and Euro-American line genotypes (LAM, S, Ural)

Генотип, субтип (ген), позиция Genotype, subtype (gene) position	Праймеры Primers	ДНК-зонды DNA-probes	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C	Источник структуры праймеров и зондов Source of primer and probe sequences
Beijing, B0/W148 (<i>kdpD</i>) 1151304	F 5'-GGCGGCACGATTTTCG GCTAC-3' R 5'-TCGTCGTCGAATCACCAAGACGA-3'	5'-FAM-GGCGGGCTCA[LNA-C]AG[LNA-T]GGTGATC-3'-RTQ1) 5'-R6G-GGCGGG CTCA[LNA-G]TGGTGATCG[LNA-A]T-3'-BHQ2	64	Eurasian Patent N 032489
Beijing, Central Asian Russian (<i>pkS17</i>) 1887060	F 5'-AGGTTCGATGGGGCCTGGAATT-3', R 5'-GAAAACAACACAAACGCTGACAC-3'	5'-FAM-ATGAGCTCAC(G-LNA)CGGC(A-LNA)CCTG-3'-RTQ1; 5'-R6G-ATGAGCTCAC(C-LNA)CGGC(A-LNA)CCTG-3'-BHQ2)	62	[23]
S (<i>Rv0557</i>) 648992	F 5'-GCATTCCGATGACAGCAGC R 5'- GATTCCATTGTCGCTGTGGA	5'-FAM-GGTTCCGCCACTTGCATCG (G-LNA)CT -BHQ1; 5'-R6G-GGTTCCGCCACTTGCATCG (C-LNA)CT -BHQ1	60	Настоящее исследование This study
Ural (<i>CinA</i>) 2147906	F 5'-GACCTGATCGTCACCAGCG R 5'-CGTCCAGCACCAGCTCGC	5'-FAM-GACCGCCGACGATATGA [T-LNA]CG-BHQ1; 5'-R6G-GACCGCCGACGATATGA [C-LNA]CG-BHQ1	62	Настоящее исследование This study
LAM (<i>Rv3062</i>) 3426795	F 5'-TGGTGCTCGCGGTGGAATGG R 5'-CATCACGAATCCACCGGTAG	5'-FAM-CGCGGCAAGCTCTC [C-LNA]AATAT- BHQ1; 5'-R6G -CGCGGCAAGCTCTC [G-LNA]AATAT- BHQ1	62	Настоящее исследование This study

различий между двумя группами. Скорректированные поправкой Йейтса значения χ^2 и p были рассчитаны с 95% доверительным интервалом. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Участники исследования

В исследование были включены 163 клинических изолята, взятых от больных (126 мужчин и 47 женщин) ТБ, преимущественно впервые выявленных (83,9%). От пациентов с ВИЧ-инфекцией получены 84 (52,8%) образца. Клиническими формами ТБ были инфильтративный (38,5%), диссеминированный (41,6%), фиброзно-кавернозный (5,0%), казеозная пневмония (6,8%), туберкулёмы (4,3%) лёгких, 4 (2,5%) случая внелёгочных форм ТБ. Основная клиническая информация о пациентах, от которых получены исследуемые изоляты, представлена в **табл. 2**.

Для определения генотипической структуры популяции МБТ использовали комбинацию молекулярных методов развёрнутой схемы генотипирования и экспресс-методы SNP-анализа — выявление маркеров генотипов по специфическим для них SNP. Первым этапом был проведён делеционный анализ по регионам различия RD 105 и 207 всех образцов, который разделил выборку на 2 группы,

из них 110 (67,5%) из 163 изолятов принадлежали к Beijing-генотипу, остальные 52 определены как non-Beijing и 1 смешанный образец (Beijing/non-Beijing — mix). Все Beijing-штаммы имели делецию в регионе различий RD 181, они отнесены к современной подлинии этого генотипа.

Результаты MIRU-VNTR-типирования

MIRU-VNTR-24-локусное типирование 163 штаммов выявило 75 профилей, классифицированных по MLVA MtbC15-9 схеме (**рис. 2**), 29 из которых принадлежали Beijing и 46 — non-Beijing. По результатам генотипирования, кроме Beijing, были идентифицированы генотипы евро-американской генетической линии (L4): LAM (6,7%; 11/163), Ural (7,4%; 12/163), Haarlem (4,9%; 8/163) и группа штаммов, относящихся к L4, но не дающих однозначной принадлежности к определённому генотипу по 24-локусному профилю и условно называемая L4-unclassified (12,9%; 21/163) [20]. Смешанный образец нёс профили генотипов Beijing и Ural. К генотипу Beijing принадлежали 85 кластеризованных изолятов: типы 100-32 (29 изолятов) и 94-32 (50 изолятов), а также по 3 штамма с профилями 1065-32 и 1068-32. Группа non-Beijing имела 5 кластеров, каждый из которых содержал 2–3 изолята (LAM-генотипа — 121-496 и 1119-52; Ural — 163-15; и 4 профиля, принадлежащих L4 unclassified).

Таблица 2. Общая характеристика исследуемой выборки штаммов *M. tuberculosis*

Table 2. General characteristics of the studied sample of *M. tuberculosis* strains

Показатели Characteristics	Впервые выявленные случаи ТБ ^a Newly identified cases of TB ^a	Ранее леченные случаи ТБ ^b Previously treated TB cases ^b
Мужчины, %; <i>n</i> (ДИ) Men, %; <i>n</i> (CI)	97; 71,9 (63,7–78,8)	18; 69,2 (44,0–77,4)
Позитивный ВИЧ-статус ^c , %; <i>n</i> (ДИ) Positive HIV status ^c , %; <i>n</i> (CI)	75; 56,4 (47,9–64,5)	9; 40,9 (23,2–61,3)
Средний возраст на момент выявления ТБ, Ме [IQR]: Mean age at TB detection, Me [IQR]:		
мужчины men	41,3 (29,4–53,2)	38,5 (28,1–48,9)
женщины women	44,5 (31,1–57,9)	40,0 (28,2–51,8)
Клинические формы ТБ лёгких, %; <i>n</i> (ДИ): TB clinical forms, %; <i>n</i> (CI):		
инфильтративный infiltrative	58; 43,0 (34,9–51,4)	4; 15,4 (5,5–31,1)
диссеминированный disseminate	58; 43,0 (34,9–51,4)	9; 34,6 (19,3–53,9)
фиброзно-кавернозный fibrous-cavernous	5; 3,7 (1,4–8,6)	3; 11,5 (3,2–29,8)
очаговый focal	2; 1,5 (0,7–5,6)	0
туберкулемы tuberculoma	2; 1,5 (0,7–5,6)	5; 19,2 (8,1–38,3)
казеозная пневмония caseosis pneumonia	6; 4,4 (1,9–9,6)	5; 19,2 (8,1–38,3)
Другие локализации ТБ, %; <i>n</i> (ДИ): Other TB locations, %; <i>n</i> (CI):		
ТБ внутригрудных лимфоузлов TB of intrathoracic lymph nodes	3; 2,2 (0,5–6,6)	0
ТБ менингит TB meningitis	1; 0,7 (0,1–4,5)	0
Лекарственная устойчивость ^c , %; <i>n</i> (ДИ): Drug resistance ^c , %; <i>n</i> (CI):		
чувствительные sensitive	54; 40,0 (32,6–49,1)	4; 15,4 (5,5–34,1)
монорезистентные monoresistant	10; 7,4 (4,0–13,4)	1; 3,8 (0–20,5)
полирезистентные polyresistant	19; 14,1 (9,3–21,3)	0
МЛУ multidrug-resistant TB:	52; 38,5 (31,2–47,6)	21; 80,8 (61,7–92,0)
из них пре-ШЛУ ^d of them pre-extensively drug-resistant ^d	9; 17,3 (9,1–30,0)	4; 19,0 (7,0–40,6)

Примечание. ^aИнформация о группе диспансерного учёта, сведения о клинических формах ТБ была доступна для 161 пациента (135 впервые выявленных и 26 ранее леченных больных); данные ВИЧ-статуса — для 155 пациентов (соответственно для 133 и 22 больных); данные о лекарственной устойчивости изолятов МБТ — для 159 пациентов (соответственно 133 и 26 больных).

^bРанее леченные случаи включали рецидив ТБ, лечение после неэффективного курса химиотерапии, лечение после прерывания курса химиотерапии, переведённый для продолжения лечения.

^cРаспределение изолятов по лекарственной устойчивости имело значимые отличия среди впервые выявленных и ранее леченных случаев ТБ (χ^2 ; *df* = 3; *p* = 0,002).

^dРасчет произведён к общему количеству штаммов в МЛУ и пре-ШЛУ.

Note. ^aInformation on the dispensary group, data on clinical forms of TB was available for 161 patients (135 newly identified and 26 previously treated patients); HIV status data — for 155 patients (respectively for 133 and 22 patients); data on drug resistance of MBT isolates — for 159 patients (133 and 26 patients, respectively).

^bPreviously treated cases included: relapse of tuberculosis, treatment after an ineffective course of chemotherapy, treatment after interruption of the course of chemotherapy, transferred to continue treatment.

^cThe distribution of isolates by drug resistance had significant differences among newly identified and previously treated TB cases (χ^2 ; *df* = 3; *p* = 0.002).

^dCalculation was made for the total number of strains in MDR and pre-XDR.

Результаты SNP-анализа и сопоставление с данными MIRU-VNTR-типирования

Штаммы Beijing были протестированы на наличие маркеров основных российских субтипов. Beijing Central Asian Russian выявлен в 39,9% (65/163) случаев общей выборки, Beijing B0/W148 — в 20,9% (34/163). Остальные 11 штаммов не имели SNP, специфических для вышеперечисленных субтипов. Beijing B0/W148, определяемый по наличию делеции в гене *kdpD*, состоял в боль-

шинстве случаев из штаммов 100-32 (85,3% — 29/34), а также разнообразной группы с профилями 100-387, 1048-499, 1075-32, 99-32, 9370-32. Субтип Central Asian Russian наиболее часто был представлен профилем 94-32 (76,9% 50/65), а также разнообразной группой индивидуальных профилей и 2 кластеризованных (1065-32 и 1068-32). Среди 52 non-Beijing-изолятов и 1 mix в тестировании на генотипы евро-американской линии были обнаружены представители LAM (6,7%; 11/163), Ural

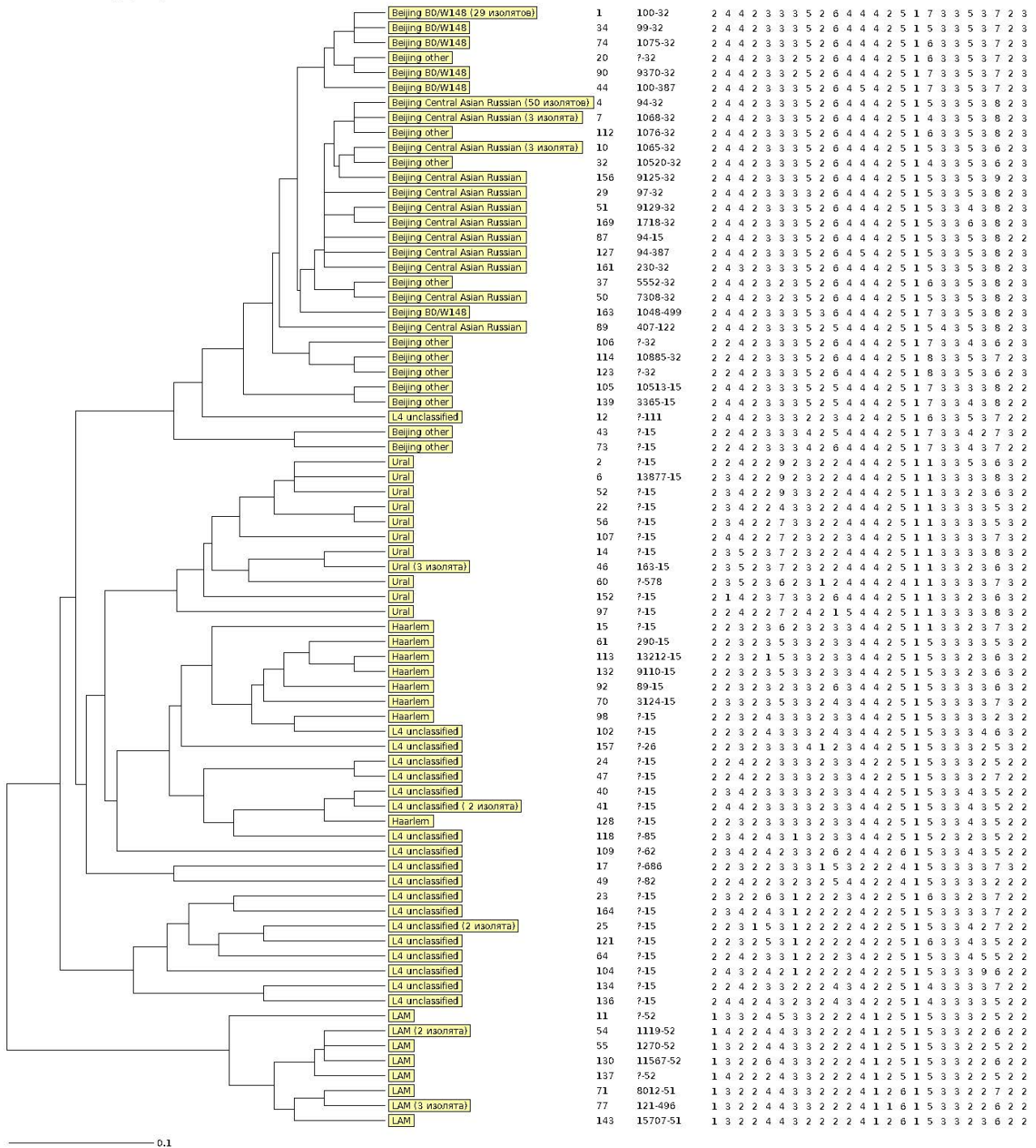


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма MIRU-VNTR-профилей 163 штаммов *M. tuberculosis* из Кемеровской области.

Каждая строка содержит данные изолята с идентифицированным генотипом в жёлтом блоке с указанием количества в случае выявления идентичных профилей; идентификационного номера изолята; MLVA MtbC15-9 типа; числа повторов в каждом из 24 локусов.

Fig. 2. UPGMA dendrogram of MIRU-VNTR profiles of 163 *M. tuberculosis* strains from the Kemerovo Region.

Each line contains isolate data with an identified genotype in a yellow block indicating the number of isolates if identical profiles are detected; isolate identification number; MLVA type MtbC15-9; number of repeats at each of the 24 loci.

(7,4%; 12/163) и группа из 29 штаммов без специфических маркеров. В смешанном образце выявлен только маркер генотипа Ural.

Генотипы МБТ и их субтипы, классифицированные по MIRU-VNTR-24-профилям, полностью

совпадали с результатами SNP-анализа (табл. 3). Beijing Central Asian Russian и Beijing B0/W148 включали изоляты с профилями, принадлежащими только к этим субтипам, согласно наиболее полному каталогу [16]. Группа «Beijing другие» не имела

Таблица 3. Сопоставление результатов MIRU-VNTR- и SNP-типирования

Table 3. Comparison of MIRU-VNTR results and SNP typing

Генотип, субтип (выявленные штаммы в SNP-анализе) Genotype, Subtype (strains identified in SNP analysis)	MIRU-VNTR-24-генотипирование MIRU-VNTR 24 genotyping	
	число выявленных штаммов identified strains	MLVA MtbC15-9 тип* (n) MLVA MtbC15-9 type * (n)
Beijing Central Asian Russian (65)	65	94-32 (50); 94-15 (1); 94-387 (1); 97-32 (1); 230-32 (1); 407-32 (1); 1065-32 (3); 1068-32 (3); 1718-32 (1); 7308-32 (1); 9125-32 (1); 9129-32 (1)
Beijing B0/W148 (34)	34	100-32 (29); 100-387 (1); 99-32 (1); 1048-439 (1); 1075-32 (1); 9370-32 (1)
Beijing, другие other Beijing (11)	11	1076-32 (1); 3365-15 (1); 5552-32 (1); 10520-32 (1); 10885-32 (1); 10513-32 (1); ?-15 (2); ?-32 (3)
LAM (11)	11	121-496 (3); 1119-52 (1); 1270-52 (1); 8012-51 (1); 11567-52 (1); 15707-51 (1); ?-52 (2)
Ural (12)	12	163-15 (3); 13877-15 (1); ?-15 (7); ?-578 (1)
S (0)	0	Отсутствовали Absent
non-Beijing другие (29) other non-Beijing	29, в том числе including Haarlem (8)	89-15 (1); 290-15 (1); 3124-15 (1); 9110-15 (1); 13212-15 (1); ?-15 (18); ?-26 (1); ?-62 (1); ?-82 (1); ?-85 (1); ?-111 (1); ?-686 (1)

Примечание. «?» — неклассифицированные по MLVA MtbC типы.

Note. «?» indicates the types unclassified by MLVA MtbC.

маркеров вышеперечисленных субтипов и характерных для них профилей.

Изолятам с наличием маркеров LAM и Ural соответствовали профили этих же генотипов, охарактеризованных ранее [17, 18]. Ни один штамм из группы non-Beijing не имел профилей генотипа S [19] и его специфического маркера. У оставшихся 29 изолятов «non-Beijing другие» не было тестируемых замен, они относились к генотипу Haarlem и L4 unclassified по MIRU-VNTR-24.

Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*

Тестирование МБТ показало, что только 55 (34,6%) сохранили лекарственную чувствительность, в большей степени за счёт впервые выявленных случаев (40,0% против 15,4% ранее леченных). Остальные были устойчивы к препаратам 1-го ряда в различных комбинациях, таким как изониазид (59,1%), рифампицин (46,5%), стрептомицин (58,5%) и этамбутол (43,4%), и к препаратам 2-го ряда, включая этионамид (6,9%), офлоксацин (8,2%), канамицин (5,0%), капреомидин (3,1%), парааминосалициловую кислоту (1,9%). Учитывая недавние изменения в определениях широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) и пре-ШЛУ, структура лекарственно-устойчивых штаммов представлена в табл. 1 и табл. 4. МЛУ, определяемая как одновременная устойчивость к рифампицину и изониазиду, выявлена у 74 (46,5%) изолятов (в том числе у 46 из 84 штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов), из них 13 — пре-ШЛУ (МЛУ с дополнительной устойчивостью к одному из фторхинолонов⁴). ШЛУ — МЛУ с резистентностью к любому

фторхинолону и как минимум к одному дополнительному препарату 2-го ряда (бедаквилину и/или линезолиду) — не была выявлена ни в одном случае. В целом устойчивость к бедаквилину была определена у 3,1% (5/161) штаммов: 2 монорезистентных, 2 полирезистентных и 1 МЛУ-штамма. Присутствие фенотипической устойчивости к бедаквилину может быть связано с естественной резистентностью [21, 22], нельзя исключить и возможность технических ошибок. Ожидается, что в спектре лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* от больных, ранее получавших ПТП, значимо чаще встречались случаи МЛУ ($p = 0,004$). Вместе с тем частоты выявления пре-ШЛУ-штаммов не имели значимых различий у пациентов с историей лечения и новых случаев ТБ ($p = 0,283$). Штаммы от ВИЧ-инфицированных с большей частотой показывали МЛУ-профиль (54,8%), чем МБТ от больных с ТБ без ВИЧ-инфекции (35,2%; $p = 0,005$).

Основные клинико-диагностические характеристики ТБ, вызванного различными генотипами и субтипами *M. tuberculosis*

Стратификация основных характеристик ТБ в соответствии с генотипом МБТ показала ряд закономерностей (табл. 5). Сходное распределение изолятов отмечается при различных клинических формах ТБ, которое отвечает общей генотипической структуре изучаемой выборки. Однако среди ранее леченных случаев ТБ частота генотипа Beijing вы-

⁴ WHO. World Health Organization (2021). Meeting report of

the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020. World Health Organization. 02.05.2023.
URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338776>

Таблица 4. Лекарственная устойчивость штаммов *M. tuberculosis* от больных ТБ с различным ВИЧ-статусом**Table 4.** Drug resistance of *M. tuberculosis* strains from TB patients with different HIV status

Показатели лекарственной устойчивости Drug resistance	ВИЧ-положительные пациенты HIV positive patients (n = 84)		ВИЧ-негативные пациенты HIV negative patients (n = 71)		Общая выборка Total sample (n = 159)	
	абс. abs.	% (ДИ CI)	абс. abs.	% (ДИ CI)	абс. abs.	% (ДИ CI)
Чувствительные Sensitive	23	27,4 (18,9–37,8)	31	43,7 (32,7–55,2)	55	34,6 (27,6–42,3)
Монорезистентные Monoresistant	6	7,1 (3,0–15,1)	5	7,0 (2,7–15,8)	11	6,9 (3,8–12,1)
Полирезистентные Polyresistant	9	10,7 (5,5–19,3)	10	14,1 (7,6–24,2)	19	11,9 (7,7–18,0)
МЛУ MDR	46	54,8 (44,1–65,0)	25	35,2 (25,1–46,8)	73	46,5 (38,4–53,7)
из них, пре-ШЛУ of them pre-XDR	9	10,7 (5,5–19,3)	4	5,6 (1,8–14,0)	13	8,2 (4,7–13,6)

Примечание. Данные ВИЧ-статуса были доступны для 155 случаев; данные о лекарственной устойчивости — для 159.
Note. HIV status data were available for 155 cases; data on drug resistance — for 159.

Таблица 5. Клинические характеристики, вызванные разными генотипами**Table 5.** Clinical characteristics depending on different genotypes

Клинические характеристики/генотипы Clinical characteristics/genotypes	n	Beijing B0/W148 (n = 32)		Beijing Central Asian Russian (n = 65)		Beijing, общее total (n = 110)		Non-Beijing, общее total (n = 52)	
		абс. abs.	% (ДИ CI)	абс. abs.	% (ДИ CI)	абс. abs.	% (ДИ CI)	абс. abs.	% (ДИ CI)
Основные клинические формы ТБ лёгких: Major clinical forms of pulmonary TB:									
инфильтративный infiltrative	62	12	19,4 (11,3–31,0)	25	40,3 (29,0–52,8)	42	67,7 (55,3–78,1)	20	32,3 (21,9–44,7)
диссеминированный disseminate	67	11	16,4 (9,3–27,2)	29	43,3 (32,1–55,2)	44	65,7 (53,7–75,9)	22	32,8 (22,8–44,8)
фиброзно-кавернозный fibrous-cavernous	8	2	25,0 (6,3–59,9)	2	25,0 (6,3–59,9)	4	50,0 (21,5–78,5)	4	50,0 (21,5–78,5)
КП caseosis pneumonia	11	2	18,2 (4,0–48,9)	3	27,3 (9,2–57,1)	6	54,5 (28,0–78,8)	5	45,5 (21,3–72,0)
Группа диспансерного учёта: Dispensary group:									
впервые выявленные newly identified TB cases	135	24	17,8 (12,2–25,2)	55	40,7 (32,8–49,2)	87	64,4 (56,1–72,0)	47	34,8 (27,3–43,3)
ранее леченные previously treated TB cases	26	10	38,5 (22,4–57,5)	10	38,5 (22,4–57,5)	23	88,5 (70,2–96,8)	5	19,2 (8,1–38,3)
ВИЧ-статус: HIV status:									
положительный positive	84	22	26,4 (16,9–35,6)	36	42,9 (32,8–53,5)	63	75,0 (64,7–83,1)	20	23,8 (15,9–34,0)
негативный negative	71	10	14,1 (7,6–24,2)	26	36,6 (26,4–48,3)	41	57,7 (46,1–68,6)	30	42,3 (31,5–53,9)

Примечание. % рассчитан на n штаммов в строке характеристики.
Note. % is calculated for n strains in the characteristic line.

ше, чем среди впервые выявленных (23/26 против 87/135; $p = 0,029$). Такое же значимое превышение обнаружено в случаях ТБ, вызванного Beijing B0/W148 (38,5% против 17,8%; $p = 0,035$) на фоне сравнимых уровней других субтипов Beijing (для Beijing Central Asian Russian: 38,5% против 40,7%; $p = 0,828$; Beijing другие: 11,5% против 5,9%; $p = 0,539$). ВИЧ-положительные случаи ТБ чаще были

вызваны штаммами генотипа Beijing (75,0% против 57,7%; $p = 0,026$), чем ТБ у ВИЧ-негативных больных, без значимой ассоциации с Beijing эпидемическими субтипами (для B0/W148: 26,2% против 14,1%; $p = 0,063$; для Beijing Central Asian Russian: 42,9% против 36,6%; $p = 0,429$).

Распределение генотипов с зависимости от статуса лекарственной устойчивости также имело

свои особенности (табл. 6). Из 74 МЛУ-изолятов 68 принадлежали к Beijing-генотипу и 7 — к генетической евро-американской линии (L4), в том числе в смешанном образце. Уровень МЛУ среди генотипов Beijing (61,8%; 68/110) и non-Beijing (11,5%; 6/52) отличался ($p < 0,001$). Эпидемический субтип Beijing B0/W148 был в 85,3% случаев с МЛУ + пре-ШЛУ, при этом изоляты с профилем 100-32 типа, как и остальные варианты B0/W148, имели близкие частоты (82,8 и 100% соответственно; $p = 0,748$). В штаммах субтипов Beijing Central Asian Russian МЛУ + пре-ШЛУ определена в 50,8% (33/65) случаев. Наиболее распространённый вариант этого субтипа — Beijing 94-32 типа — значимо чаще нёс МЛУ + пре-ШЛУ (62,0%), чем остальные его варианты (13,3%; $p = 0,003$). Изоляты non-Beijing были в основном лекарственно-чувствительными (59,6%; 31/52). Выявленные 6 случаев МЛУ среди non-Beijing включали представителей Haarlem, Ural и LAM. В разнообразной группе L4 unclassified присутствовали только чувствительные, моно- и полирезистентные штаммы.

Обсуждение

В условиях ограниченных ресурсов наиболее перспективно направление приоритетного мониторинга штаммов МБТ высокого риска передачи в целевой популяции. Обязательным этапом такого динамического наблюдения является первичный скрининг циркулирующей популяции МБТ в конкретных условиях, что и было выполнено нами в настоящем исследовании на ранее малоизученной территории Кемеровской области. Совершенствование методологии мониторинга возбудителя ТБ путём комплексного использования классических методов типирования и легко воспроизводимых молекулярных тестов SNP-анализа обеспечивает преимущество результатов первичного и динамического наблюдения конкретных штаммов МБТ, ответственных за наиболее актуальные проблемы передачи возбудителя ТБ. Именно такой подход был реализован в настоящем исследовании, где, кроме развёрнутой схемы MIRU-VNTR-типирования, были применены уже ранее успешно используемые тесты на Beijing B0/W148 и Beijing Central Asian

Таблица 6. Генотипы и лекарственная устойчивость изолятов *M. tuberculosis* из Кемеровской области, % (ДИ)
Table 6. Genotypes and drug resistance of *M. tuberculosis* isolates from the Kemerovo Region, % (CI)

Генотип/субтип Genotype/Subtype	Чувствительные Sensitive	Монорезистентные Monoresistant	Полирезистентные Polyresistant	МЛУ MDR	Пре-ШЛУ Pre-XDR	Общая выборка General sample
<i>n</i>	58	11	19	60	13	163
Beijing общее Beijing total	44,8 (32,8–57,6)	36,4 (15,0–64,8)	57,9 (36,2–76,9)	91,7 (81,5–96,8)	92,3 (64,6–100,0)	67,5 (60,0–74,2)
Beijing B0/W148*	44,8 (0–10,3)	9,1 (0–40,0)	5,3 (0–26,5)	40,0 (28,6–52,7)	40,0 (28,6–52,7)	20,9 (15,3–27,8)
Beijing Central Asian Russian	39,7 (28,1–52,5)	18,2 (4,0–48,9)	36,8 (19,1–59,1)	43,3 (31,6–55,9)	53,9 (29,1–76,8)	39,9 (32,7–47,6)
Beijing другие Beijing other	3,5 (0,2–12,4)	9,1 (0–40,0)	15,8 (4,7–38,4)	8,3 (3,2–18,5)	0	6,8 (3,7–11,8)
Non-Beijing общее Non-Beijing total	53,5 (40,8–65,7)	63,6 (35,2–85,0)	42,1 (23,1–63,8)	8,3 (3,2–18,5)	7,7 (0–35,4)	31,9 (25,2–39,4)
LAM	6,9 (2,2–16,9)	27,3 (9,2–57,1)	15,8 (4,7–38,4)	0	7,7 (0–35,4)	6,8 (3,7–11,8)
Ural	8,6 (3,3–19,1)	9,1 (0–40,0)	15,8 (4,7–38,4)	5,0 (1,2–14,3)	0	7,4 (4,2–12,5)
Haarlem	6,9 (2,2–16,9)	9,1 (0–40,0)	5,3 (0–26,5)	3,3 (1,2–14,3)	0	4,9 (2,4–9,5)
L4 inclassified	31,0 (20,6–43,9)	18,2 (4,0–48,9)	5,3 (0–26,5)	0	0	12,9 (8,5–19,0)
Mix (Beijing/Ural)	1,8 (0–10,3)	0	0	0	0	0,6 (0–3,7)

Примечание. Чувствительные — лекарственная чувствительность сохранена ко всем ПТП; монорезистентные — к 1 ПТП; полирезистентные — к 2 и более ПТП, но не к рифампицину и изониазиду; МЛУ (не ШЛУ) — к рифампицину и изониазиду и другим ПТП, но не к фторхинолонам и бедаквилину и линезолиду. Beijing другие — изоляты генотипа Beijing, не имеющие маркеров B0/W148 и Central Asian Russian кластеров.

*Данные о лекарственной устойчивости доступны для 32 из 34 идентифицированных Beijing B0/W148.

Note. Sensitive — drug sensitivity is maintained to all anti-tuberculosis drugs; mono-resistant — drug sensitivity to one anti-tuberculosis drug; polyresistant — drug sensitivity to 2 or more anti-tuberculosis drugs, but not to rifampicin and isoniazid; MDR (not XDR) — drug sensitivity to rifampicin and isoniazid and other anti-tuberculosis drug, but not to fluoroquinolones and bedaquiline and linezolid. Beijing, other — isolates of the Beijing genotype that do not have markers of B0/W148 and Central Asian Russian clusters.

*Drug resistance data are available for 32 of the 34 identified Beijing B0/W148 strains.

Russian [23–25] и апробированные впервые способы детекции генотипов S, LAM и Ural в формате ПЦР-РВ.

Результаты молекулярно-генетического скрининга популяции МБТ в Кемеровской области, показали, что, как и на многих территориях азиатской части России, преобладают штаммы генотипов Beijing (67,5%) и его эпидемически значимые кластеры Central Asian Russian (39,9%) и B0/W148 (20,9%) [3, 6, 7, 26]. Частоты обнаружения основных субтипов Beijing близки ранее опубликованным данным по Западной Сибири (Новосибирская, Томская и Омская области) [10, 20], однако значительно отличаются от представленных в недавнем исследовании [9], где доля Beijing составила 95% выборки, а доля B0/W148 превышала обнаруживаемые в Сибири частоты в 2 раза (46,4%). При этом количество включённых штаммов из Кемеровской области в этом исследовании не приведено и предполагать о каких-либо изменениях в динамике структуры пока не представляется возможным.

В настоящем исследовании группа non-Beijing также состояла из наиболее часто встречаемых генотипов LAM (6,7%), Ural (7,4%), Haarlem (4,9%) и L4-unclassified (12,9%). По частоте встречаемости LAM занимает 2-е место в большинстве азиатских регионов России (от 12,0 до 19,5%) [6–10]. Распространённость LAM в европейской части России и ряде стран бывшего СССР варьирует от 13,3% в Калининграде до 29,4% в Карелии [17]. Немаловажную роль среди non-Beijing-генотипов играет Ural, ранее считавшийся маловирулентным и лекарственно-чувствительным [18, 26], однако получившие недавно распространение новые его эпидемические кластеры с МЛУ [27] определяют актуальность его отслеживания в современной популяции МБТ. Штаммы Haarlem, обнаруженные в 4,9% случаев в сибирских регионах, являются минорными и по отношению к другим представителям евро-американской линии и часто являются лекарственно-чувствительными, в то время как в Южной Америке этот генотип сопровождается МЛУ в половине случаев (43,6%) [28]. Изоляты генотипа S не встречались в изучаемой выборке, что может быть естественным в ограниченных условиях проведения скрининга и при незначительной циркуляции этого генотипа в Сибири и на Дальнем Востоке (2–7% случаев), за исключением его эндемического распространения в Республике Саха (Якутии) [6, 10, 25, 26, 29].

Кемеровская область — Кузбасс имеет один из самых высоких уровней первичной МЛУ (35,0%) в Сибирском федеральном округе после Республики Тывы и Новосибирской области [30]. Поэтому важным результатом этого исследования является обнаружение факта, что стабильно высокий уровень МЛУ в популяционной структуре (46,5%) обеспечивается преимущественно штаммами geno-

типа Beijing (61,8%). Его эпидемический субтип — Beijing B0/W148 — был в 85,3% случаев с МЛУ и представлял пятую часть проанализированной нами выборки (20,9%). При этом штаммы Beijing B0/W148 с разными профилями MIRU-VNTR имели МЛУ со сходной частотой. Предыдущие исследования в Западной Сибири показали, что генотип Beijing также чаще встречался в образцах МЛУ-ТБ (71%) по сравнению с общими данными по ТБ (47%) [7, 10]. Сохранение стабильно высокого уровня МЛУ у гетерогенной группы Beijing B0/W148 также показано на других территориях, в частности в Восточной Сибири [6].

Напротив, в неоднородной группе Central Asian Russian кластера общий показатель МЛУ был ниже, чем у B0/W148 (50,8 и 85,3% соответственно), но штаммы одного профиля — 94-32 — имели значительно большую долю МЛУ (62,0%) по сравнению с остальными профилями (13,3%). Это может быть связано с присутствием среди группы 94-32 штаммов Central Asia Outbreak, которые характеризуются тем же профилем, но несут значительно чаще МЛУ [31]. Учитывая близость к Кемеровской области Казахстана, где наблюдается градиент распространённости Central Asia Outbreak в Центральной Азии, а также обнаружение штаммов этого субтипа в соседних областях (Новосибирской, Томской), высока вероятность связи МЛУ именно с этим вариантом возбудителя ТБ. Однако на данном этапе скрининга выявленный факт только нацеливает на более углублённое исследование Central Asian Russian кластера в дальнейшем мониторинге Кемеровской области.

Высокий уровень коинфекции ВИЧ-ТБ в Кемеровской области [30] нашёл отражение в скрининговой выборке. Более половины образцов составили штаммы МБТ, полученные от больных ВИЧ-ТБ (56,4%). При этом ВИЧ-позитивные случаи ТБ чаще были вызваны штаммами генотипа Beijing (75,0% против 57,7%) и МЛУ (54,8% против 35,2%), чем ТБ у ВИЧ-негативных больных, без значимой ассоциации с Beijing эпидемическими кластерами. По данным других российских исследователей азиатской части России, ассоциация сочетанной ВИЧ-ТБ-инфекции с МЛУ является устойчивой, однако связь с отдельными генотипами и субтипами Beijing носит неоднозначный характер [10, 32, 33]. Для выяснения роли основных кластеров в развитии сочетанной ВИЧ-ТБ-инфекции на территории Кемеровской области необходимы динамические и более масштабные исследования репрезентативной выборки этой группы пациентов.

Результаты использования в настоящем исследовании комплексного подхода молекулярного анализа циркулирующих в Кемеровской области МБТ также показали, что расширенное генотипирование MIRU-VNTR-24 с набором разработанных нами ПЦР-РВ-тестов имеет полную идентификационную

совместимость. Такой набор следует дополнить тестами на ещё один значимый кластер генотипа Beijing — Central Asia Outbreak — и ряд минорных генотипов евро-американской линии (Haarlem, T) и эндемичных субтипов генотипа Beijing (в частности, 1071-32 и 14717-15), чтобы охватить более 95% популяции МБТ, характерной для азиатских территорий России. В представленном наборе тесты могут быть уже рекомендованы для быстрого скрининга ретроспективных коллекций и для проспективного мониторинга штаммов МБТ.

Ограничения исследования. Настоящее исследование было ограничено выборкой штаммов МБТ, выявленных у больных, получавших преимущественно стационарное лечение в противотуберкулёзных диспансерах Кемеровской области, что отразилось в более высокой доле лекарственно-устойчивых изолятов МБТ по сравнению с популяционными исследованиями. Кроме того, мы не смогли использовать типирование MIRU-VNTR по 24 локусам для определения генотипа 21 изолятов, отнесённых к non-Beijing и сгруппированных в группу L4 unclassified.

Заключение

Выявлено доминирование изолятов группы Beijing (67,5%) и его эпидемических кластеров Beijing Central Asian Russian и B0/W148 (39,9 и 20,9% соответственно), которые значительно отличались по уровням МЛУ (50,8 и 85,3% соответственно; $p = 0,005$). Вторыми по распространённости были штаммы евро-американской линии (31,9%): LAM (6,7%), Ural (7,4%), Haarlem (4,9%) и L4-unclassified (12,9%). МЛУ среди этих минорных генотипов была значительно ниже, чем среди Beijing, и составляла 11,5% ($p < 0,001$). Штаммы от больных ВИЧ-ТБ (56,4% общей выборки) несли чаще МЛУ-профиль (54,8%), чем в случаях ТБ без ВИЧ-инфекции (35,2%; $p = 0,005$), что может быть связано с более высокими уровнями Beijing в группе больных ВИЧ-ТБ (75,0% против 57,7%; $p = 0,026$). Показана полная сопоставимость разработанных нами тестов SNP-анализа для выявления основных генотипов и эпидемически значимых субтипов Beijing, позволивших охарактеризовать 75,5% выборки экспресс-методом.

Использование 24-локусного VNTR-типирования и экспресс-методов позволило определить структуру различных генетических линий МБТ, включая доминирующий Beijing и его эпидемически значимые субтипы Central Asian Russian и B0/W148, генотипы LAM, Ural и Haarlem, распространённость которых в основном совпадает с другими регионами Западной и Восточной Сибири. Особенностью популяции МБТ на территории Кемеровской области является значительное распространение штаммов генотипа Beijing, обладающих МЛУ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Васильева И.А., Тестов В.В., Стерликов С.А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 — 2020–2021 гг. *Туберкулёз и болезни лёгких*. 2022;100(3):6–12. Vasilyeva I.A., Testov V.V., Sterlikov S.A. Tuberculosis situation in the years of the COVID-19 pandemic – 2020–2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2022;100(3):6–12. DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12> EDN: <https://elibrary.ru/dpmdcf>
2. Ревякина О.В., Филиппова О.П., Фелькер И.Г. и др. *Туберкулёз в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах: информационно-аналитический обзор*. Новосибирск;2020. Revyakina O.V., Filippova O.P., Felker I.G., et al. *Tuberculosis in the Siberian and Far Eastern federal Districts: Information and Analytical Review*. Novosibirsk;2020. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36433.56169> EDN: <https://elibrary.ru/cfghih>
3. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., et al. Russian 'successful' clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(11):3757–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02001-12>
4. Mokrousov I., Chernyaeva E., Vyazovaya A., et al. Rapid assay for detection of the epidemiologically important central Asian/Russian strain of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J. Clin. Microbiol.* 2018;56(2):e01551-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01551-17>
5. 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>
6. Zhdanova S., Mokrousov I., Orlova E., et al. Transborder molecular analysis of drug-resistant tuberculosis in Mongolia and Eastern Siberia, Russia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022;69(5):e1800–14. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14515>
7. Dymova M.A., Cherednichenko A.G., Alkhovik O.I., et al. Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Siberia. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:478. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-478>
8. Umpeleva T., Belousova K., Golubeva L., et al. Molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* in the "closed" Russian town with limited population migration. *Infect. Genet. Evol.* 2020;79:104174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104174>
9. Vyazovaya A., Felker I., Schwartz Y., Mokrousov I. Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* from referral clinics in Western Siberia, Russia: Before and during the COVID-19 pandemic. *Infect. Genet. Evol.* 2022;103:105343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105343>
10. Dymova M.A., Kinsht V.N., Cherednichenko A.G., et al. Highest prevalence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation. *J. Med. Microbiol.* 2011;60(Pt. 7):1003–9. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.027995-0>
11. Reed M.B., Pichler V.K., McIntosh F., et al. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(4):1119–28. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02142-08>
12. Shitikov E., Kolchenko S., Mokrousov I., et al. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage

- of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.* 2017;7(1):9227.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10018-5>
13. Homolka S., Projahn M., Feuerriegel S., et al. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2012;7(7):e39855.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039855>
 14. Mulholland C.V., Shockey A.C., Aung H.L., et al. Dispersal of *Mycobacterium tuberculosis* driven by historical european trade in the South Pacific. *Front. Microbiol.* 2019;10:2778.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02778>
 15. Mokrousov I., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary markers. *J. Bacteriol.* 2014;196(10):1833–41. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01485-13>
 16. Merker M., Blin C., Mona S., et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat. Genet.* 2015;47(3):242–9.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.3195>
 17. Mokrousov I., Vyazovaya A., Iwamoto T., et al. Latin-American-Mediterranean lineage of *Mycobacterium tuberculosis*: Human traces across pathogen's phylogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2016;99:133–43.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.020>
 18. Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2015;95(Suppl. 1):S167–76.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.031>
 19. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Алексеева Г.И. и др. Генетическое разнообразие изолятов микобактерий туберкулеза из Республики Саха (Якутия), Россия. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016;34(2):43–8.
DOI: <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2016-34-2-43-48>
EDN: <https://elibrary.ru/vzydoh>
Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Sinkov V.V., et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2016;31(2):51–7.
DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416816020105>
EDN: <https://elibrary.ru/xfjfst>
 20. 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>
 21. Villellas C., Coeck N., Meehan C.J., et al. Unexpected high prevalence of resistance-associated Rv0678 variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017;72(3):684–90.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw502>
 22. Peretokina I.V., Krylova L.Y., Antonova O.V., et al. Reduced susceptibility and resistance to bedaquiline in clinical *M. tuberculosis* isolates. *J. Infect.* 2020;80(5):527–35.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.007>
 23. Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н. и др. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулеза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62(10):622–7. Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., et al. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017;62(10):622–7.
DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627>
EDN: <https://elibrary.ru/zoladv>
 24. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Савилов Е.Д., Кондратов И.Г. Применение молекулярно-генетических инструментов для оценки трансграничной передачи туберкулеза в Иркутской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022; 21(2):59–65. Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Savelov E.D., Kondratov I.G. Application of new molecular genetic strategies for transborder transmission analysis of tuberculosis in Irkutsk region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(2):59–65.
DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-2-59-65>
EDN: <https://elibrary.ru/ymgdfc>
 25. Pasechnik O., Dymova M.A., Stasenko V.L., et al. Molecular & genetic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the southern part of West Siberia. *Indian J. Med. Res.* 2017;146(1):49–55.
DOI: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_162_16
 26. Умпелева Т.В., Кравченко М.А., Еремеева Н.И. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории уральского региона России. *Инфекция и иммунитет*. 2013;3(1):21–8. Umpeleva T.V., Kravchenko M.A., Eremeeva N.I., et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the Ural region, Russia. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2013;3(1):21–8.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2013-1-21-28>
EDN: <https://elibrary.ru/qcubwd>
 27. Sinkov V., Ogarkov O., Mokrousov I., et al. New epidemic cluster of pre-extensively drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Ural family emerging in Eastern Europe. *BMC Genomics*. 2018;19(1):762.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5162-3>
 28. Tarashi S., Fateh A., Jamnani F.R., et al. Prevalence of Beijing and Haarlem genotypes among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Iran: systematic review and meta-analysis. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2017;107:31–7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.03.005>
 29. Zhdanova S., Heysell S.K., Ogarkov O., et al. Primary multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in 2 regions, Eastern Siberia, Russian Federation. *Emerg. Infect. Dis.* 2013;19(10):1649–52.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1910.121108>
 30. Лебедева И.Б., Осинцева И.Ю., Бондаренко Т.Е. и др. COVID-19 в популяции больных туберкулёзом: эпидемиологическая и клиническая характеристика. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2021;6(3): 71–84. Lebedeva I.B., Osintseva I.Yu., Bondarenko T.E., et al. COVID-19 in patients with tuberculosis: epidemiological and clinical features. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2021;6(3):71–84.
DOI: <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2021-6-3-71-84>
EDN: <https://elibrary.ru/twfkna>
 31. Филиппова О.П., Павленок И.В., Гордеева Е.И. и др. Основные показатели противотуберкулёзной деятельности в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах: статистические материалы. Новосибирск;2021. Filippova O.P., Pavlenok I.V., Gordeeva E.I., et al. *The main indicators of anti-tuberculosis activity in the Siberian and Far Eastern Federal Districts: statistical Materials*. Novosibirsk;2021.
EDN: <https://elibrary.ru/fsxdks>
 32. Микова О.Е., Жданова С.Н., Сергеевнин В.И. и др. Высокая распространённость генотипа В0/W148 *Mycobacterium tuberculosis* у больных ВИЧ-инфекцией, сочетанной с туберкулёзом, в Пермском крае и Иркутской области. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук*. 2016;1(5):142–5. Mikova O.E., Zhdanova S.N., Sergevnin V.I.,

et al. High prevalence of genotype B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* among HIV-TB patients in Perm Krai and Irkutsk region. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;1(5):142–5. DOI: <https://doi.org/10.12737/23412>

EDN: <https://elibrary.ru/wxbrvf>

33. Вязовая А.А., Пасечник О.А., Герасимова А.А., Мокроусов И.В. Структура популяции генетического семейства

Beijing *Mycobacterium tuberculosis* на территории Западной Сибири. *Туберкулез и болезни легких*. 2020;98(5):32–6. Vyazovaya A.A., Pasechnik O.A., Gerasimova A.A., Mokrousov I.V. The population structure of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Siberia. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2020;98(5):32–6.

DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-5-32-36>
EDN: <https://elibrary.ru/mmedwz>

Информация об авторах

Лебедева Ирина Борисовна[✉] — аспирант каф. эпидемиологии, инфекционных болезней и дерматовенерологии Кемеровского государственного медицинского университета, Кемерово, Россия, lib_2008@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3848-9206>

Жданова Светлана Николаевна — д.м.н., в.н.с. Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7160-9700>

Кондратов Илья Геннадьевич — к.б.н., н.с. Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Сибиль Кирилл Валерьевич — к.м.н., главный врач Кузбасского клинического фтизиопульмонологического медицинского центра им. И.Ф. Копыловой, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-1993-3249>

Огарков Олег Борисович — д.м.н., г.н.с., директор Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Брусина Елена Борисовна — д.м.н., профессор, зав. каф. эпидемиологии, инфекционных болезней и дерматовенерологии Кемеровского государственного медицинского университета, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

Участие авторов: *Лебедева И.Б.* — валидация результатов и написание статьи; *Жданова С.Н.* — концептуализация, методология и написание статьи; *Кондратов И.Г.* — валидация результатов и написание статьи; *Сибиль К.В.* — администрирование и редакция статьи; *Огарков О.Б.* — концептуализация и редакция статьи; *Брусина Е.Б.* — методология и редакция статьи.

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

Статья поступила в редакцию 23.09.2023;
принята к публикации 17.11.2023;
опубликована 06.12.2023

Information about the authors

Irina B. Lebedeva[✉] — postgraduate Student, Department of epidemiology, infectious diseases and dermatovenerology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, lib_2008@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3848-9206>

Svetlana N. Zhdanova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Department of epidemiology and microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7160-9700>

Ilya G. Kondratov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of epidemiology and microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Cyril V. Sibil — Cand. Sci. (Med.), Chief doctor, Kuzbass Clinical Phthisiopulmonological Medical Center named after I.F. Kopylova, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-1993-3249>

Oleg B. Ogarkov — D. Sci. (Med.), Head, Department of epidemiology and microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Elena B. Brusina — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of epidemiology, infectious diseases and dermatovenerology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

Author contribution. *Lebedeva I.B.* — validation of results and writing of the article; *Zhdanova S.N.* — conceptualization, methodology and writing of the article; *Kondratov I.G.* — validation of results and writing of the article; *Sibil C.V.* — administration and revision of the article; *Ogarkov O.B.* — conceptualization and revision of the article; *Brusina E.B.* — methodology and revision of the article.


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 23.09.2023;
accepted for publication 17.11.2023;
published 06.12.2023

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-395>

The adaptive potential of North American subtype H7N2 avian influenza viruses to mammals

Aleksandr V. Lyashko¹, Irina A. Rudneva¹, Dmitrii N. Shcherbinin¹, Natalia F. Lomakina¹, Anastasia A. Treshchalina², Irina M. Kupriyanova¹, Alexandra S. Gambaryan², Elena B. Timofeeva¹, Aleksandr A. Shilov¹, Galina K. Sadykova¹, Alexey G. Prilipov¹, Boris I. Timofeev¹, Maxim M. Shmarov^{1,3}, Elena L. Ryazanova³, Tatiana A. Timofeeva¹

¹Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. H7 subtype avian influenza viruses causing severe epizootics among birds are phylogenetically different in the Eastern and Western hemispheres. Numerous human infections caused by these viruses in the Eastern hemisphere indicate that H7 viruses can overcome the interspecies barrier and pose a potential threat of a new pandemic. The H7N2 viruses with deletion of amino acids 221–228 (H3 numbering) in hemagglutinin (HA) had been circulating among poultry in the Western Hemisphere during 1996–2006, and had once again been detected in 2016 in an animal shelter, where they caused cat diseases.

The objective of this study is to elucidate the mechanism of adaptation to mammals of North American H7N2 influenza viruses with deletion in HA.

Materials and methods. The A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (H7N2) virus was adapted to mice by the lung passages. Complete genomes of original and mouse-adapted viruses were analyzed. The receptor specificity and thermostability of viruses, HA activation pH and virulence for mice were determined.

Results. The non-pathogenic H7N2 avian influenza virus became pathogenic after 10 passages in mice. Amino acid substitutions occurred in five viral proteins: one in PB2 (*E627K*), NA (*K127N*), NEP (*E14Q*), four in HA and six in NS1. Mutations in HA slightly changed receptor specificity but increased the pH of HA activation by 0.4 units. The NS1 protein undergone the greatest changes in the positions (*N73T*, *S114G*, *K118R*, *G171A*, *F214L* and *G224R*), where amino acid polymorphisms were observed in the original virus, but only minor amino acid variants have been preserved in the mouse adapted variant.

Conclusion. The results show that H7N2 viruses have the potential to adapt to mammals. The increase in virulence is most likely due to the adaptive *E627K* mutation in PB2 and possibly in HA.

Keywords: H7N2 influenza virus; adaptation to mammals; adaptive mutations

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 D.I. Ivanovsky Institute of Virology of the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya (protocol No. 12, 28 June, 2021).

Acknowledgement. The authors thank the staff of the Genome Analysis Laboratory of the N.F. Gamaleya Federal State Budgetary Institution of the Russian Ministry of Health O.L. Voronina, E.I. Aksenova, M.S. Kunda and N.N. Ryzhova for the complete genome sequencing of viruses on the Illumina platform.

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: Lyashko A.V., Rudneva I.A., Shcherbinin D.N., Lomakina N.F., Treshchalina A.A., Kupriyanova I.M., Gambaryan A.S., Timofeeva E.B., Shilov A.A., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Timofeev B.I., Shmarov M.M., Ryazanova E.L., Timofeeva T.A. The adaptive potential of North American subtype H7N2 avian influenza viruses to mammals. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):442–453.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-395>

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

Потенциал адаптации к млекопитающим вирусам гриппа птиц H7N2 североамериканской линии

Ляшко А.В.¹, Руднева И.А.¹, Щербинин Д.Н.¹, Ломакина Н.Ф.¹, Трещалина А.А.²,
Куприянова И.М.¹, Гамбарян А.С.², Тимофеева Е.Б.¹, Шилов А.А.¹, Садыкова Г.К.¹,
Прилипов А.Г.¹, Тимофеев Б.И.¹, Шмаров М.М.^{1,3}, Рязанова Е.Л.³, Тимофеева Т.А.¹

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

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

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

Аннотация

Введение. Вирусы гриппа птиц подтипа H7 вызывают тяжёлые эпизоотии среди птиц и филогенетически различаются в Восточном и Западном полушарии. Многочисленные случаи заражения людей этими вирусами в Восточном полушарии указывают на то, что вирусы H7 могут преодолевать межвидовой барьер и представляют потенциальную угрозу новой пандемии. Вирусы H7N2 с делецией аминокислот 221–228 (в нумерации H3) в гемагглютинине (HA) циркулировали среди домашней птицы в Западном полушарии в 1996–2006 гг. и вновь были обнаружены в 2016 г. в приюте для животных, где вызвали заболевание кошек. **Цель работы** — выяснить механизм адаптации к млекопитающим вирусам гриппа североамериканской линии H7N2 с делецией в HA.

Материалы и методы. Вирус A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (H7N2) был адаптирован к мышам пассированием через лёгкие. Проведён анализ полных геномов исходного и адаптированного к мышам вариантов вируса. Определены специфичность вирусов к аналогам клеточных рецепторов, термостабильность HA, значение pH активации HA, вирулентность для мышей.

Результаты. Непатогенный птичий вирус гриппа H7N2 после 10 пассажей на мышах стал патогенным. В 5 вирусных белках произошли аминокислотные замены: по 1 в PB2 (E627K), NA (K127N), NP (E14Q), 4 в HA, 6 в NS1. Мутации в HA слабо повлияли на рецепторную специфичность, но способствовали возрастанию значения pH активации HA на 0,4 единицы. Наибольшим изменениям подвергся белок NS1 в позициях N73T, S114G, K118R, G171A, F214L и G224R, где в исходном варианте наблюдался полиморфизм, а в адаптированном варианте сохранились только минорные альтернативные аминокислоты.

Заключение. Из результатов следует, что вирусы H7N2 обладают потенциалом адаптации к млекопитающим. Возрастание вирулентности, скорее всего, обусловлено адаптационной мутацией E627K в PB2 и, возможно, мутациями в HA.

Ключевые слова: вирус гриппа подтипа H7N2, адаптация к млекопитающим, адаптационные мутации

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 Комитетом по этике Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи (протокол № 12 от 28.06.2021).

Благодарность. Авторы благодарят сотрудников лаборатории анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи О.Л. Воронину, Е.И. Аксенову, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжову за полногеномное секвенирование вирусов на платформе «Illumina».

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: Ляшко А.В., Руднева И.А., Щербинин Д.Н., Ломакина Н.Ф., Трещалина А.А., Куприянова И.М., Гамбарян А.С., Тимофеева Е.Б., Шилов А.А., Садыкова Г.К., Прилипов А.Г., Тимофеев Б.И., Шмаров М.М., Рязанова Е.Л., Тимофеева Т.А. Потенциал адаптации к млекопитающим вирусам гриппа птиц H7N2 североамериканской линии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):442–453. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-395>
EDN: <https://www.elibrary.ru/yphkuu>

Introduction

Subtype H7 influenza A viruses are associated with severe epizootics of avian influenza in poultry, predominantly of the order *Galliformes*. H7 influenza viruses are divided into low-pathogenic (non-pathogenic) and highly pathogenic viruses based on their virulence properties [1]. Low-pathogenic viruses circulate asymptotically among domestic and wild aquatic and semi-aquatic birds [2, 3]. Highly pathogenic viruses are mainly isolated from domestic birds, in which they cause disease with characteristic signs and are fatal [4]. During epizootics in affected regions, highly pathogenic H7 viruses have also been detected in various species of synanthropic and wild birds [5, 6].

Cases of human infection with H7 virus were recorded in the twentieth century in individuals that were in close contact with infected birds. In 2003, the first mass infection was observed in 82 poultry farm workers during the epizootic of highly pathogenic influenza subtype H7N7 in the Netherlands. The infection manifested as conjunctivitis and/or mild influenza-like illness, and in 1 case the disease was fatal [7].

Between 2013 and 2017, 5 waves of H7N9 influenza epidemics affected China. Both low- and high-pathogenic avian influenza viruses caused the epidemics. During the entire period, 1,568 sick people were registered, of whom 616 died. The source of human infection were live poultry markets and backyard poultry farms, where low-pathogenic H7 viruses had been asymptotically present since 2013 [3, 6]. In 2016, a highly pathogenic H7 virus emerged in southern China (Guangdong Province) that differed dramatically in properties and clinical symptoms from those previously present and evolved from a precursor of one of the numerous lineages of the low-pathogenic H7 virus that had been circulating in China since 2013 [6, 8-10].

Fatal severe pulmonary illnesses in humans have raised the concerns of the World Health Organization (WHO) about the potential threat of a new H7 subtype virus pandemic. A program to counteract a potential pandemic was developed¹, which drove scientists from different countries to study the features of avian influenza viruses of subtype H7.

Phylogenetically, all H7 subtype viruses are divided into Western Hemisphere viruses, Eastern Hemisphere viruses and the equine influenza virus lineage. Among the viruses of the Eastern Hemisphere, the Australian virus lineage is the one that stands out. The remaining isolates belong to the well-studied Eurasian lineage and form numerous branches on the evolutionary tree reflecting their geographical distribution [11].

H7 viruses of the Western Hemisphere are divided into three large clusters and several clades, based on HA sequence analysis [12]. The virus researched in the present study belongs to clade II-2 of the North American lineage.

Low-pathogenic H7 viruses cause asymptomatic infection in wild waterfowl. Their introduction into domestic bird populations may remain undetected for a long time if the virus does not cause clinical symptoms [2, 4, 10]. Circulation among domestic birds (part of the order *Galliformes*) promotes the accumulation of mutations that lead to changes in virulence and the formation of highly pathogenic viruses [4, 8, 10, 13].

During the years 1959–2019, 27 independent events of origin of highly pathogenic H7 influenza viruses from a low-pathogenic precursor were observed in different parts of the world [13].

The leading role in the evolution and pathogenicity of H7 influenza viruses is played by the surface protein hemagglutinin (HA), which contains the main antigenic determinants of the virus. At the stage of virus entry into the cell, HA allows binding to cellular receptors [14] and mediates the fusion of the viral and cellular membranes [15]. The determinant of pathogenicity of H7 viruses is the structure of the proteolytic cleavage site of the HA precursor: in nonpathogenic strains there is a single amino acid residue of arginine (R), while in highly pathogenic strains there is an insertion of several basic amino acids [1, 13].

The host specificity of influenza viruses is determined by their ability to recognize receptors characteristic of a particular host species. Avian receptors are sialoglycosides with the alpha2-3 binding type, and human (possibly other mammalian) receptors are sialoglycosides with the alpha2-6 binding type. The structure of the HA receptor-binding pocket of all influenza viruses is formed by three constituent elements (in H3 numbering): loop-130 (a.a. 134–138), loop-190 (a.a. 188–194) and loop-220 (a.a. 221–228). Mutations in these HA regions resulted in virus adaptation to humans and the formation of pandemic strains of H1N1 (*E190D/G225D*) and H2N2/H3N2 (*Q226L* and *G228S*) subtypes [14, 16].

For interspecies host transmission, influenza viruses must have the ability to recognize the receptors of the new host and adapt to use host cellular factors that the virus requires for successful reproduction. Mutations that facilitate adaptation to a new host primarily affect the HA and neuraminidase (NA) surface proteins, polymerase complex proteins, and the nonstructural NS1 protein. The NS1 protein inhibits host antiviral defense signaling and suppresses the expression of its proteins. NS1 performs multiple functions through interactions with proteins, RNA and other host cell factors, which differ between hosts. Differences in the primary structure of NS1 in specialized viruses of different host species reflect the high plasticity of this protein,

¹ The PIP Framework's Partnership Contribution (PC) High-Level Implementation Plan II 2018–2023 (HLIP-II).
URL: <https://www.who.int/publications/i/item/pip-pc-preparedness-high-level-implementation-plan-ii-2018-2023>

which plays an important role in overcoming the interspecies barrier and adapting the virus to a new host [17, 18]. A virus adapted to new conditions must not only multiply in a new organism, but also be transmitted from one individual to another, i.e. it must be highly contagious. So far, no proven cases of human-to-human transmission of H7Nx viruses have been recorded², infection occurred through close contact with the source of infection, mainly with infected poultry.

In 1996, low-pathogenic H7 viruses with deletion of 8 amino acids (p. 221–228 in the H3 numbering) in the HA were detected in live poultry markets in the northeastern United States – they lacked loop-220 in the receptor-binding site region [2]. A North American virus lineage with the deletion (clade II-2) circulated in the northeastern United States from 1996 to 2006 in poultry [12]. The viruses had a HA cleavage site of a low virulence phenotype [2] and had a dual receptor specificity, i.e., along with high affinity for avian-type receptors (alpha2-3), they showed moderate binding to human-specific receptors (alpha2-6) [11, 16, 19]. Two arginine residues, R220 and R229, which are adjacent due to the deletion in positions 221–228 (in H3 numbering), play an essential role in preserving the tertiary structure of HA and providing dual receptor specificity, as shown by a study of the North American A/New York/107/2004 (H7N2) virus (clade II-2) isolated from humans [16].

The capability of H7N2 viruses to recognize human-type receptors indicates an increased potential to overcome the interspecies barrier and adapt to humans or other mammalian species.

During the circulation of H7N2 subtype viruses (1994–2006), two laboratory-confirmed human infection cases with these viruses were reported in the northeastern region of the United States. More recently, from December 2016 to February 2017, an outbreak of respiratory infection among domestic cats was observed in animal shelters in New York City. The cause of the illness in about 500 cats turned out to be a low-pathogenic H7N2 influenza virus with deletion in HA. An influenza-like infection was observed in a veterinarian who had close contact with an infected cat. Sequencing of 6 isolates from cats and 1 isolate from human showed that all 8 segments of the feline viruses were phylogenetically similar to low-pathogenic chicken viruses circulating in New York in the late 1990s and early 2000s. The viruses from cats and human were nearly identical and lacked mammalian adaptation mutations [20, 21].

The possibility of crossing the interspecies barrier by H7N2 viruses with deletion of loop-220 in HA prompted us to investigate the mechanism of adaptation of these viruses to mammals on the example of one of

the representatives of this lineage — virus A/chicken/New Jersey/294598-12/2004.

The objective of this study was to elucidate the mechanism of adaptation to mammals of North American H7N2 influenza viruses with deletion in HA.

Materials and Methods

The A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) virus (GenBank EU743253-EU743260) maintained in chicken embryos (CE) was provided by Dr A.I. Klimov, CDC USA (CDC-2004708596). Cloning of the virus by limiting dilutions in CE resulted in the A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (ch/NJ) variant, which was used in the present study as the original virus.

Adaptation of the virus to propagation in the lungs of white outbred mice was performed as described previously [25]. 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). Animal studies were approved by the Ethics Committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (Protocol No. 12 of 28.06.2021).

The hemagglutination reaction (HGA) was performed according to the generally accepted method [1]. The 50% embryonic infectious dose (EID₅₀/ml) of influenza viruses was determined as described in [25], each virus dilution was used for inoculation of 5 CEs. The mean EID₅₀/ml for each virus was calculated using the method developed by L.J. Reed and H. Muench [22].

The 50% lethal dose (LD₅₀) of influenza virus was determined in BALB/c mice according to [25], 6 mice per group were used for each virus dilution. The value of LD₅₀/ml was calculated using Kerber's method modified by Ashmarin [23].

Sequencing on the MiSeq platform (Illumina) was performed by O.L. Voronina, E.I. Akse-nova, M.S. Kunda, and N.N. Ryzhova (GenBank, MN400380-MN400395) of the Laboratory of Genome Analysis of the N.F. Gamaleya NRCM. Libraries were prepared according to [24], sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina) using the 600-cycle MiSeq Reagent Kit v3 cartridge. The *de novo* and reference A/chicken/NJ/294508-12/2004(H7N2) (EU743253-EU743260, GenBank) genomes were assembled using the CLC Genomics Workbench 10.0 program.

Sequencing by the Sanger method was performed as described previously in [25]. The National Center for Biotechnology Information³ and Influenza Research Database⁴ (IRD) were used for structural and functional analysis of nucleotide and amino acid sequences.

² Avian influenza A (H7N9) virus outbreak.
URL: [https://www.who.int/emergencies/situations/avian-influenza-a-\(h7n9\)-virus-outbreak](https://www.who.int/emergencies/situations/avian-influenza-a-(h7n9)-virus-outbreak)

³ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁴ URL: <https://www.bv-brc.org>

The thermostability of influenza virus hemagglutinin was determined as described previously in [25]. The inactivation temperature was considered to be the temperature at which, after 40 min of virus incubation, the HA titer decreased by $6\log_2$.

The pH value of HA activation was determined by the erythrocyte hemolysis method [25], which is based on the ability of HA to agglutinate erythrocytes at neutral pH values and cause their hemolysis at low values due to a conformational change in HA.

The affinity of viruses to cell receptor analogues was determined by interaction with sialooligosaccharides conjugated with biotin-labelled high-molecular-weight polyacrylamide [14]. The sialooligosaccharides used were Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β (3'SLN) and Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β (6'SLN). Results were expressed as dissociation constant calculated in sialic acid nanomoles (K_{diss} , nM SA).

Statistical processing of the data was performed using the parametric Student's t-test (activation pH and thermostability of HA), non-parametric Friedman's criterion (ANOVA) and Mann-Whitney (virus titer) at a critical significance level of $p \leq 0.05$. MS Office Excel 2016 and Statistica 8.0 programs were used to perform the corresponding calculations. The obtained results are presented as the arithmetic mean (activation pH and thermostability of HA) or geometric mean (virus titer) with standard deviation.

Results

Adaptation to mice

Adaptation of avian influenza A/chicken/NJ/294598-12/2004 (ch/NJ) virus to reproduction in the lungs of mice was carried out by serial passages through the lungs. After 10 passages, a variant was obtained that caused death of mice with extensive hemorrhagic lung lesions. The obtained variant was cloned once by the method of limiting dilutions in chicken embryos to obtain a homogeneous viral population, named A/chicken/NJ/294598-12MA/2004 (MA/NJ) and deposited in the State Virus Collection (division of the Ivanovsky Institute of Virology of the N.F. Gamaleya NRCEM) under the number 2890.

Phenotypic properties of viruses

The original cloned ch/NJ variant accumulated in the EC at a titer of 9.6 IgEID₅₀, while the MA/NJ variant adapted to mice had a similar titer of 9.7 IgEID₅₀.

The original ch/NJ and mouse-adapted MA/NJ variants were examined for pathogenicity to mice, receptor specificity, virus thermostability and HA activation pH value (Table 1).

The original virus had an avirulent phenotype for mice: mice remained alive after intranasal infection with extremely high virus doses of 8.6 and 9.6 IgEID₅₀ per mouse. In contrast, the adapted MA/NJ variant at lower doses of 4.7 IgEID₅₀ per mouse caused death of 100% of the animals with characteristic changes in the lungs.

The increased virulence of MA/NJ was accompanied by an increase in the pH value of HA activation by 0.4 units compared to the original ch/NJ virus (Table 1).

When receptor specificity was determined, both virus variants bound to fetuin, which is characteristic of all influenza viruses. Their affinity for the avian receptor analogue 3'SLN was slightly higher than for the human receptor analogue 6'SLN; the adapted MA/NJ variant had a greater decrease in affinity for the human receptor than the original ch/NJ virus.

Sequencing

Sequencing on the Illumina platform yielded ambiguous results for some positions in segments 4 and 8, so additional sequencing was performed using the Sanger method. The results of sequencing by different methods coincided (Table 2). The original ch/NJ virus was found to be a heterogeneous population with polymorphisms in segments 4 and 8. Sequential passages in mouse lungs yielded a homogeneous virus population with fixation of amino acids that were present as minor amino acid variants in the original virus. The exception was position 125/133 in HA, where heterogeneity (F < L) was observed in the MA/NJ variant, which was absent in the original virus. In the MA/NJ variant, amino acid substitutions were detected in 5 proteins: 1 each in PB2, NA, NEP, 4 in HA, and 6 in NS1.

Table 1. Phenotypic properties of the original (ch/NJ) and mouse-adapted (MA/NJ) variants of the virus A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2)

Virus	Virulence*	Thermostability, °C	HA activation pH values [#]	Affinity for cell receptor analogues, K_{diss} nM SA**		
				Fet-HRP	3'SLN	6'SLN [#]
ch/NJ	> 9,6 (avirulent)	62,3 ± 0,2	5,2 ± 0,1	200 ± 100	100 ± 50	200 ± 50
MA/NJ	4,0 ± 0,2	62,3 ± 0,2	5,6 ± 0,1	200 ± 100	100 ± 50	500 ± 50

Note. The average values of three independent experiments are presented. [#] $p \leq 0.05$ (Student's criterion).

* Virulence for mice is represented as \log_{10} of EID₅₀ in one unit of LD₅₀. A lower value corresponds to a higher pathogenicity.

** The results of titration with peroxidase-labeled fetuin conjugate (Fet-HRP) and biotinylated polymers 3'SLN (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β) and 6'SLN (6'SLN — Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β) are presented as a dissociation constant expressed in nanomoles of sialic acid. A higher value corresponds to a lower affinity for cellular receptor analogues.

Table 2. Amino acid differences in the original (ch/NJ) and mouse-adapted (MA/NJ) variants of the A/chicken/New Jersey/294598-12/2004 (H7N2) virus

Protein	Amino acid position	ch/NJ ²	MA/NJ
PB2	627	E	K
HA ¹	125/133	F	L > F
HA	156/164	D > N	N
HA	198/207	G	E
HA	328/330	K	T
NA	127	K	N
NS1	73	N > T	T
NS1	114	S > G	G
NS1	118	K > R	R
NS1	171	G > A	A
NS1	214	F > L	L
NS1	224	R = G	R
NEP	14	E > Q	Q

Note. ¹The numbering of HA corresponds to H3/H7. Numbering is given for the mature HA/H3 protein of strain A/Aichi/2/68, and for HA/H7 according to the sequence ACF25499 (GenBank).

² The ratio of alternative amino acids. The predominant amino acid is in bold font.

Discussion

Analysis of amino acid substitutions in viral proteins

The *E627K* substitution in the **PB2** polymerase protein is considered to be a mammalian adaptation. It increases the polymerase activity of viral polymerase and increases the pathogenicity of the virus for mammals [26-28]. It can be assumed that the increase in virulence for mice of the MA/NJ variant is because of this mutation.

Neuraminidase of both variants has deletion of 16 amino acids (p. 56-71)⁵ in the stem part of the molecule. The *K127N* (143) substitution (numbering according to QEL43992, GenBank) in the neuraminidase of subtype N2 is located in the head of the molecule protruding on the virion surface. It is part of experimentally determined epitopes that are polymorphic at this position according to IRD data. Amino acid 127K (143K) makes contact with amino acid 450F (466F) of the neighboring NA homotetramer chain. Replacement of amino acid 127K with an extended side chain with 127N with a short side chain could theoretically affect the contact of neighboring chains. For North American H7N2 viruses, this substitution is unique. However, in different years, 127N was present in 146 natural iso-

lates of exclusively avian (mainly chicken) viruses of other subtypes – H9N2 and H6N2 in China, non-pathogenic H5N2 viruses in the USA and Mexico.

In **HA** belonging to clade II-2 of the North American virus with deletion, adaptation to mice resulted in 4 substitutions: F125/133L, D156/164N, G198/207E, K328/330T (Table 2, **Table 3**), which had little effect on the receptor specificity of the MA/NJ variant (Table 1) and did not alter the thermostability of HA.

In MA/NJ, the K328/330T mutation located in the HA cleavage site at position –2 was observed. The cleavage site structure of ch/NJ and MA/NJ viruses, EKPKKKR↓G and EKPKTR↓G, corresponds to the apathogenic phenotype. According to IRD data, both structures are found in H7 viruses from different avian species in North America.

The IRD database has 1107 complete HA sequences of H7 subtype viruses isolated in North America between 1996 and 2022, among them 230 that have deletion of loop 220 in the HA (Table 3). Viruses with loop-220 deletion are represented by isolates from 1996–2006 and 2016. The viruses were isolated from the environment, from chickens, some poultry species, wild duck, 2 strains were isolated from humans — one in 2003 and another in 2016, when 6 strains were isolated from cats. We analyzed the variability of amino acids at positions where substitutions were found in MA/NJ virus. Table 3 shows that only 2 substitutions are noteworthy in the mouse-adapted variant, the L-dominated F/L polymorphism at positions F125/133L and G198/207E, since the other two positions (156/164 and 328/330) represent one of the alternative amino acids present in natural isolates.

In the original virus, F is located at position 125/133, as in natural H7 viruses. In MA/NJ, an F/L polymorphism with a predominance of L is observed. The presence of L at this position is very rare. Among natural H7 viruses with this substitution, 13 isolates were found in different parts of the world, among which only 2 were found in the USA (A/chicken/New York/Sg-00307/1998, H7N2 and A/American green-winged teal/Illinois/10OS4014/2010, H7N3). This rare occurrence indicates low competitive fitness of HA with this mutation among avian influenza viruses.

Analysis of H7N2 viruses of the North American lineage isolated in 1999-2006 indicates that all these viruses have an N at position 156/164. The observed polymorphism in the original ch/NJ variant with a predominance of D at this position is most likely a special case.

The D156/164N mutation in the mouse-adapted virus replaces a negatively charged amino acid with a neutral one. The G198/207E substitution with a negative charge shift is also rare among the group of viruses studied. It is possible that the two charge-shifting mutations at positions D156/164N and G198/207E located on the HA surface may affect its conformation depending on the pH of the medium.

⁵ In this subsection, the NA numbering of the reference strain is given in parentheses A/Tokyo/3/1967(H2N2), AAO46245, GenBank; PDB: 1INH.

Table 3. Mutations in HA/H7 of a mouse-adapted virus and alternative amino acids in these positions in natural isolates isolated in North America in 1996-2022

Position H3/H7	Amino acid, virus variant		The number of H7 viruses with the indicated amino acid		Functional domain	Reference
	ch/NJ	MA/NJ	viruses of different hosts, n = 1107			
			viruses of different hosts, n = 1107	HA with 220 loop deletion, n = 230*		
125/133	F	F/L	L = 3, F = 1104	F = 230	Antigenic site	[9]
156/164	N/D	N	N = 1094, D = 4, K = 1, S = 8	N = 227, S = 3	Antigenic site	[9]
198/207	G	E	E = 5, G = 1102	E = 1, G = 229	Antigenic site	[9]
328/330	K	T	A = 8, K = 47, P = 211, T = 824	K = 46, P = 184	Cleavage site	[2]

Note. *The sampling did not include laboratory obtained strains, for example, escape mutants.

Changes in NS1 and NEP proteins

In the adaptation process of the chicken ch/NJ virus to the mammalian organism, the segment 8, in which a polymorphism at 9 positions in nucleotide sequence was initially observed, underwent the greatest changes. In the adapted variant, the nucleotides present in the original variant in a smaller proportion became fixed. Among these, 6 nucleotides resulted in the substitution of 6 amino acids in NS1 protein and 1 substitution in NEP (Table 2, Table 4).

It should be noted that in natural viruses, the NS gene is represented by two alleles: allele A is present in all mammalian influenza viruses and certain avian influenza viruses, while allele B is characteristic of avian influenza viruses only [29]. The studied A/chicken/New Jersey/294598-12/2004(H7N2) virus contains the B allele. This likely explains the high variability of the NS gene of the mouse-adapted MA/NJ variant.

The lineage of North American viruses of subtype H7 with deletion of loop-220 in HA, to which the ch/NJ virus we studied belongs, is represented by influenza viruses isolated from poultry. Among them, according to GenBank data, there is only one virus isolated from humans, A/New York/107/2003(H7N2), which

is, in fact, a virus of avian origin. Comparison of the HA and NS1 protein sequences of this virus with the ch/NJ and MA/NJ variants studied by us revealed no matching mutations in HA, while NS1 contains three mutations, *N73T*, *G171A*, and *F214L*, identical to the mouse-adapted variant.

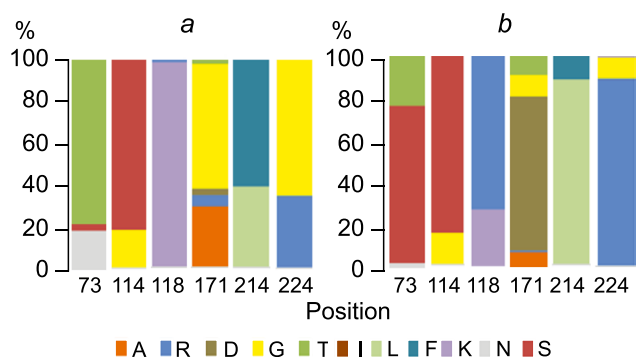
We analyzed NS1 protein variability among H7 influenza viruses of all NA (H7Nx) subtypes that were present in birds in North America from 1994–2022, as well as for H7N2 subtype viruses for 1994–2007, which included the circulating years of the virus lineage with deletion in the NA and its precursors (Table 4; Figure).

At positions 73, 114, 118, 171, 214 and 224, where MA/NJ variant substitutions occurred, there are no significant differences in the set of varying amino acids between these samples, only the percentage of specific amino acids differs (Figure). The observed difference in the distribution of amino acids in NS1 between two samples of avian influenza viruses of subtype H7, differing in subtype NA, may indicate the isolation of H7N2 viruses circulating in 1994–2007 and the existence of some relationship (linkage) between segments 4, 6, and 8 encoding HA, NA, and NS proteins in them.

Table 4. NS1 substitutions in the mouse-adapted MA/NJ variant, and their variability among North American avian H7 viruses

Mutation ¹	Amino acid variability		Domen	Location	Function ²
	H7N2, 1994–2007 (n = 263)	H7Nx, 1994–2022 (n = 908)			
<i>N73T</i>	N = 47, S = 7, T = 138	A = 1, N = 23, F = 1, P = 1, S = 656, T = 226	RNA binding domain	1–73	Binding with several RNA species, including dsRNA. Interactions with host proteins RIG-I, PABPI, and importin-alpha
<i>S114G</i>	G = 44, P = 1, S = 123	G = 133, P = 1, S = 774	Effector domain	87–203	Mediated interaction with several host cellular proteins; nuclear-cytoplasmic transport of mature mRNAs; stabilization of the N-terminal domain (1-73) due to RNA interaction
<i>K118R</i>	R = 7, K = 161	R = 658, K = 250			
<i>G171A</i>	A = 60, R = 5, D = 7, G = 85, T = 11	A = 61, R = 5, N = 2, D = 648, G = 92, T = 100			
<i>F214L</i>	I = 1, L = 75, F = 91, X = 1	I = 1, L = 790, F = 116, X = 1	C-terminal domain	204–230	Contains signaling motifs for phosphorylation (CDK/ERK), Crk/CrkL SH3 binding, PDZ ligand and NoLS/NLS2
<i>G224R</i>	R = 77, G = 90	R = 807, G = 94, K = 5, S = 1			

Note. ¹Mutation in the mouse-adapted variant (original/adapted variant). ²Based on data from [17, 18].



Positions in NS1 in which mutations occurred in the mouse-adapted MA/NJ virus variant and the variability of amino acids in them (ordinate) among avian influenza viruses subtype H7 isolated in different years in North America.

a — H7N2 subtype viruses isolated in 1994–2006;
 b — H7Nx subtype viruses isolated in 1994–2022.

All NS1 positions that underwent substitutions in the MA/NJ variant show variability (Table 4). In both the original ch/NJ and MA/NJ variants, one of the alternative amino acids is present at these positions. The detected substitutions, according to IRD data, are part of experimentally identified short linear epitopes and are also located in structurally functional domains that make multiple contacts with host factors [17, 18].

In the NEP protein adapted to mice, one *E14Q* substitution occurred in the NES signaling region (positions 12-21, nuclear export signal), which binds to the cellular transport protein CRM1 and, with its participation, ensures the exit of viral nucleoprotein complexes from the nucleus [30]. The NES signal sequence is hydrophobic (leucine- or methionine-rich region), in which the 14M substitution does not significantly affect the structure of the signaling region. Nevertheless, in WSN virus, amino acid substitution *M14Y* at this position resulted in delayed export of viral ribonucleoprotein complexes (vRNPs) from the nucleus, reduced growth properties of the virus and its attenuation in mice [30]. The structure of NES in the viruses we studied differs by only one position from the WSN virus: *M14E* in the original ch/NJ virus and *M14Q* in MA/NJ. In our case, the replacement of an amino acid with a charge change (*E14Q*) — acidic to neutral polar hydrophilic — could hypothetically influence the functioning of NES signaling.

Adaptive potential

There are only 8 H7N2 clade II-2 influenza viruses isolated from mammals for which the structure of the complete genome has been determined: these are 2 isolates from humans (A/NY/107/2003 and A/NY/108/2016) and 6 from cats [20, 21, 31]. The genome of the A/NY/108/2016 virus isolated from a human in 2016 was almost identical to the genome of the virus isolated from the cat with whom the infected person had a contact [20]. We compared the

HA and NS proteins of these viruses, as well as the MA/NJ virus with their closely related chicken virus A/chicken/NJ/294508-12/2004 to find common differences in isolates from mammals. There are no overlapping substitutions in HA between MA/NJ and mammalian viruses relative to chicken virus. For the HA protein, the similarity (divergence) to chicken virus for MA/NJ was 99.5% (0.5%), 96.6% (3.5%) for human A/NY/107/2003 virus, and 94% (6.2%) for feline and human A/NY/108/2016 viruses.

For the NS1 protein, the similarity (divergence) to chicken virus for MA/NJ was 97.4% (2.7%), 97.8% (2.2%) for human NY/107/2003 virus, 92.6% (7.3%) for 5 feline viruses (WDL) from the same shelter, and 92.2% (7.8%) for cat virus A/feline/New York/16-040082-1/2016 and human contact virus (A/NY/108/2016). In NS1, among the substitutions relative to chicken ch/NJ virus, five (*N73T*, *S114G*, *G171A*, *F214L* and *G224R*) matched in mouse-adapted MA/NJ and feline viruses, of which three (*N73T*, *G171A*, *F214L*) were identical to substitutions in the human A/New York/107/2003(H7N2) virus.

Only one matching substitution, *E14Q*, is present in NEP. In feline viruses, aside from that substitution, there are 4 other differences from the chicken virus.

As for identical mutations in mammalian H7N2 viruses (in NS1 — *N73T*, *G171A*, *F214L*, in NEP — *E14Q*), the substitution occurred on the predominant or less common amino acid among alternative ones present in natural avian isolates. This does not allow them to be recognized as adaptations without further studies.

It should be noted that H7N2 viruses isolated from humans and cats lacked the *E627K* mutation in PB2 [20, 21], which is considered to be adaptive to mammals [26–28]. According to different authors, the appearance of the *E627K* mutation during adaptation of avian influenza viruses to mice was accompanied by an increase in virulence of the virus [27, 28], as in the current case with MA/NJ. In addition to the mutation in PB2, the change in MA/NJ virulence could be affected by substitutions in HA, which contributed to an increase in the pH value of HA activation [10, 25].

Conclusion

Our studies on the adaptation of the low pathogenic H7N2 chicken influenza virus to mice, as well as the information that viruses of this lineage were able to cross the species barrier and cause an outbreak of respiratory infection in cats 10 years after their last detection in natural conditions [20, 21], indicate the presence of adaptation potential to mammals in H7N2 viruses of the North American lineage with a deletion of loop-220 in HA. Adaptation of these viruses to different mammalian species seems to have its own peculiarities, and it takes some time of circulation in a new host for the virus to acquire mutations capable of causing the clinical manifestation of infection. As the source of infection in

cats has not been identified, the question remains as to how H7N2 viruses have managed to remain undetected and out of sight of veterinary services for more than 10 years.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- World Organization for Animal Health (WOAH). Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). Chapter 3.3.4. In: *OIE Terrestrial Manual*. Paris;2021.
- Suarez D.L., Garcia M., Latimer J., et al. Phylogenetic analysis of H7 avian influenza viruses isolated from the live bird markets of the Northeast United States. *J. Virol.* 1999;73(5):3567–73. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3567-3573.1999>
- Shi J., Deng G., Ma S., et al. Rapid evolution of H7N9 highly pathogenic viruses that emerged in China in 2017. *Cell Host Microbe.* 2018;24(4):558–68.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.006>
- Capua I., Cattoli G., Terregino C., Marangon S. Avian influenza in Italy 1997–2006. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., Stech J., eds. *Avian Influenza. Monographs in Virology. Volume 27*. Basel;2008:59–70. DOI: <https://doi.org/10.1159/000151608>
- Yao Y., Zhang T., Yang W., et al. Avian influenza A (H7N9) virus in a wild land bird in central China, late 2015. *Virol Sin.* 2018;33(1):96–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0001-x>
- Li C., Chen H. H7N9 influenza virus in China. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2021;11(8):a038349. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038349>
- Fouchier R.A., Schneeberger P.M., Rozendaal F.W., et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(5):1356–61. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308352100>
- Lu J., Raghwan J., Pryce R., et al. Molecular evolution, diversity, and adaptation of influenza A(H7N9) viruses in China. *Emerg. Infect. Dis.* 2018;24(10):1795–805. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2410.171063>
- Yang H., Carney P.J., Chang J.C., et al. Structural and molecular characterization of the hemagglutinin from the fifth-epidemic-wave A(H7N9) influenza viruses. *J. Virol.* 2018; 92(16):e00375-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00375-18>
- Shi J., Deng G., Kong H., et al. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans. *Cell Res.* 2017;27(12):1409–21. DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2017.129>
- Gambaryan A.S., Matrosovich T.Y., Philipp J., et al. Receptor-binding Profiles of H7 subtype influenza viruses in different host species. *J. Virol.* 2012;86(8):4370–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.06959-11>
- Xu Y., Bailey E., Spackman E., et al. Limited antigenic diversity in contemporary H7 avian-origin influenza A viruses from North America. *Sci. Rep.* 2016;6:20688. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep20688>
- Lee D.H., Criado M.F., Swayne D.E. Pathobiological origins and evolutionary history of highly pathogenic avian influenza viruses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020;11(2):a038679. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038679>
- Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000;74(18):8502–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000>
- Hamilton B.S., Whittaker G.R., Daniel S. Influenza virus-mediated membrane fusion: determinants of hemagglutinin fusogenic activity and experimental approaches for assessing virus fusion. *Viruses.* 2012;4(7):1144–68. DOI: <https://doi.org/10.3390/v4071144>
- Yang H., Chen L.M., Carney P.J., et al. Structures of receptor complexes of a North American H7N2 influenza hemagglutinin with a loop deletion in the receptor binding site. *PLoS Pathog.* 2010;6(9):e1001081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001081>
- Васин А.В., Петрова-Бродская А.В., Плотникова М.А. и др. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека. *Вопросы вирусологии.* 2017;62(6):246–58. Vasin A.V., Petrova-Brodskaya A.V., Plotnikova M.A., et al. Evolutionary dynamics of structural and functional domains of influenza A virus NS1 protein. *Problems of Virology.* 2017;62(6):246–58. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258> EDN: <https://elibrary.ru/zuqetp>
- Evseev D., Magor K.E. Molecular evolution of the influenza A virus non-structural protein 1 in interspecies transmission and adaptation. *Front. Microbiol.* 2021;12:693204. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693204>
- Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Pazynina G.V., et al. 6-sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. *Virol. J.* 2008;5:85. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-85>
- Marinova-Petkova A., Laplante J., Jang Y., et al. Avian influenza A(H7N2) virus in human exposed to sick cats, New York, USA, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017;23(12):2046–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2312.170798>
- Hatta M., Zhong G., Gao Y., et al. Characterization of a feline influenza A(H7N2) virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2018;24(1):75–86. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2401.171240>
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27(3):493–7.
- Ашмарин И.П. Вычисление LD50 при малом числе подопытных животных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1959;30(2):102–8. Ashmarin I.P. Calculation of LD50 with a small number of experimental animals. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 1959;30(2):102–8.
- Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., et al. Genetic features of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8), isolated from the European part of the Russian Federation. *Infect. Genet. Evol.* 2018;63:144–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.022>
- Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Ломакина Н.Ф. и др. Мутации в геноме вируса гриппа птиц подтипов H1 и H5, ответственные за адаптацию к млекопитающим. *Независимые микробиологические исследования.* 2021;8(1):50–61. Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Lomakina N.F., et al. Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals. *Microbiology Independent Research Journal.* 2021;8(1): 50–61. DOI: <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61> EDN: <https://elibrary.ru/vsvzqt>
- Subbarao E.K., London W., Murphy B.R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol.* 1993;67(4):1761–4. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.67.4.1761-1764.1993>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

27. Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*. 2001;293(5536):1840–2.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1062882>
28. Zhang H., Li X., Guo J., et al. The PB2 E627K mutation contributes to the high polymerase activity and enhanced replication of H7N9 influenza virus. *J. Gen. Virol.* 2014;95 (Pt. 4):779–86.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1062882>
29. Suarez D.L., Perdue M.L. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res.* 1998;54(1):59–69.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(98\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(98)00011-2)
30. Iwatsuki-Horimoto K., Horimoto T., Fujii Y., Kawaoka Y. Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J. Virol.* 2004;78(18):10149–55.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10149-10155.2004>
31. Ostrowsky B., Huang A., Terry W., et al. Low pathogenic avian influenza A (H7N2) virus infection in immunocompromised adult, New York, USA, 2003. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(7):1128–31.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1807.111913>

Information about the authors

Aleksandr V. Lyashko — junior researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Irina A. Rudneva — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5000-2547>

Dmitrii N. Shcherbinin — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of molecular biotechnology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Natalia F. Lomakina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, nflomakina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Anastasia A. Treshchalina — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3801-2413>

Irina M. Kupriyanova — laboratory researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7301-388X>

Alexandra S. Gambaryan — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for the Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1892-0548>

Elena B. Timofeeva — research engineer, Laboratory of cellular microbiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7352-9808>

Aleksandr A. Shilov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6338-4473>

Galina K. Sadykova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular genetics, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2729-6767>

Alexey G. Prilipov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of molecular genetics, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8755-1419>

Boris I. Timofeev — Cand. Sci. (Phys.-Math.), senior researcher, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Maxim M. Shmarov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of molecular biotechnology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Assistant professor, Department of infectology and virology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Elena L. Ryazanova — Cand. Sci. (Pedagogy), Assistant professor, Department of medical and biological physics, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1375-3373>

Tatiana A. Timofeeva — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of virus physiology, Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Author contribution: *Lyashko A.V.* — animal experiments, virological and serological studies, collection and analysis of literature, writing an article; *Rudneva I.A.* — idea, concept and design of research, animal experiments, virological and serological studies; *Shcherbinin D.N.* — genomic and proteomic analysis; *Lomakina N.F.* — sequencing, genomic and proteomic analysis, collection and analysis of literature, writing an article, preparation of the manuscript for

Информация об авторах

Ляшко Александр Викторович — м.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Руднева Ирина Александровна — к.б.н., в.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5000-2547>

Щербинин Дмитрий Николаевич — к.б.н., н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Ломакина Наталья Фёдоровна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, nflomakina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2638-4244>

Трещалина Анастасия Андреевна — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3801-2413>

Куприянова Ирина Михайловна — лаборант-исследователь лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7301-388X>

Гамбарян Александра Сергеевна — д.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1892-0548>

Тимофеева Елена Борисовна — инженер-исследователь лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7352-9808>

Шилев Александр Александрович — д.б.н., в.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6338-4473>

Садькова Галина Кадымовна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной генетики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2729-6767>

Прилипов Алексей Геннадьевич — д.б.н., в.н.с., зав. лаб. молекулярной генетики НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8755-1419>

Тимофеев Борис Игоревич — к.ф.-м.н., с.н.с. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Шмаров Максим Михайлович — д.б.н., в.н.с., зав. лаб. молекулярной биотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; доцент каф. инфектологии и вирусологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Рязанова Елена Леонтьевна — к.п.н., доцент каф. медицинской и биологической физики ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1375-3373>

Тимофеева Татьяна Анатольевна — к.б.н., в.н.с., зав. лаб. физиологии вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Участие авторов: *Ляшко А.В.* — эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования, подбор и анализ литературы, написание статьи; *Руднева И.А.* — идея, концепция и дизайн исследования, эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования; *Щербинин Д.Н.* — геномный и протеомный анализ; *Ломакина Н.Ф.* — секвенирование, геномный и протеомный анализ, подбор и анализ литературы, написание статьи, подготовка рукописи к публикации; *Трещалина А.А.* — рецепторная специфичность; *Куприянова И.М.* — эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования; *Гамбарян А.С.* — рецепторная специфичность, критический анализ текста; *Тимофеева Е.Б.* — работа с базами данных и статистическая обработка; *Шилев А.А.* — геномный и протеомный анализ; *Садькова Г.К.* — секвенирование; *Прилипов А.Г.* — секвенирование; *Тимофеев Б.И.* — анализ третичной структуры белков; *Шмаров М.М.* — эксперименты на животных; *Рязанова Е.Л.* — подбор и анализ литературы; *Тимофеева Т.А.* — идея, концепция и дизайн исследования, эксперименты на животных, вирусологические и серологические исследования, написание статьи. Все авторы

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

publication; *Treshchalina A.A.* — receptor specificity; *Kupriyanova I.M.* — animal experiments, virological and serological studies; *Gambaryan A.S.* — receptor specificity, critical analysis of the text; *Timofeeva E.B.* — working with databases and statistical processing; *Shilov A.A.* — genomic and proteomic analysis; *Sadykova G.K.* — sequencing; *Prilipov A.G.* — sequencing; *Timofeev B.I.* — analysis of the tertiary structure of proteins; *Shmarov M.M.* — animal experiments; *Ryazanova E.L.* — collection and analysis of literature; *Timofeeva T.A.* — idea, concept and design of research, animal experiments, virological and serological studies, writing an article. 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.

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 28.09.2023;
принята к публикации 18.11.2023;
опубликована 28.12.2023

The article was submitted 28.09.2023;
accepted for publication 18.11.2023;
published 28.12.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-382>



Рост заболеваемости сифилисом в Российской Федерации: иностранные граждане-мигранты как группа риска распространения заболевания

Рахматулина М.Р.¹, Брико Н.И.², Новоселова Е.Ю.¹, Лопухов П.Д.^{2✉}

¹Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Москва, Россия;

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путём (ИППП), оказывает серьёзное влияние на здоровье и жизни детей, подростков и взрослого населения. Сифилис, как и большинство ИППП, относится к социально значимым заболеваниям, при этом среди факторов, влияющих на распространение данной инфекции, особое место занимают миграционные процессы, в том числе трудовая миграция.

Цель — изучить заболеваемость сифилисом у иностранных граждан-мигрантов в Российской Федерации и отдельных субъектах государства за последние годы.

Материалы и методы. Выполнен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости сифилисом среди населения России и иностранных граждан-мигрантов. Использовались данные официальной статистики по материалам форм федерального статистического наблюдения № 9 и № 34 в Российской Федерации и на отдельных территориях за 2011–2022 гг.

Результаты. Среди иностранных граждан-мигрантов уровни заболеваемости были выше, чем в целом по России: до 2020 г. — в 1,5–2,0 раза, а в 2021 и 2022 гг. — в 4 раза. Доля зарегистрированных случаев сифилиса у иностранных граждан в 2021–2022 гг. составила 36,4 и 46,0%, значительно превысив данный показатель не только в 2020 г. (18,2%), но и в предыдущие годы (16,7–21,2%). Рост числа заболевших сифилисом иностранных граждан в 2021 г. наблюдался во всех федеральных округах Российской Федерации, при этом количество выявленных случаев сифилиса у данного контингента лиц значительно варьировало в субъектах РФ. Основную долю (98,1%) в структуре сифилиса, выявленного у иностранных граждан, составили скрытые формы заболевания.

Заключение. Высокий уровень выявляемости сифилиса у иностранных граждан-мигрантов и преобладание в его структуре скрытых форм заболевания представляют потенциальную эпидемиологическую опасность распространения инфекции. В связи со сложившейся ситуацией представляются необходимыми разработка и внедрение постоянно действующих и контролируемых алгоритмов мониторинга ИППП в группах риска, в том числе среди иностранных граждан-мигрантов.

Ключевые слова: сифилис, заболеваемость, мигранты, инфекции, передаваемые половым путём

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: Рахматулина М.Р., Брико Н.И., Новоселова Е.Ю., Лопухов П.Д. Рост заболеваемости сифилисом в Российской Федерации: иностранные граждане-мигранты как группа риска распространения заболевания. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):454–461.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-382>

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

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-382>

The increase in the incidence of syphilis in the Russian Federation: foreign migrant citizens as a risk group for the spread of the disease

Margarita R. Rakhmatulina¹, Nikolay I. Briko², Elena Yu. Novoselova¹, Platon D. Lopukhov^{2✉}

¹State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Relevance. The incidence of sexually transmitted infections (STIs) has a serious impact on the health and lives of children, adolescents and adults. Syphilis, like most STIs, is a socially significant disease, while among the factors influencing the spread of this infection, migration processes, including labor migration, occupy a special place.

Aims. To study syphilis in foreign migrants in the Russian Federation and individual subjects of the state in recent years.

Material and methods. A retrospective epidemiological analysis of the incidence of syphilis among the population of the Russian Federation and foreign migrants was performed. The data from Federal Statistical Monitoring Form No. 9 and No. 34 was used with reference to STIs incidence in 2011–2022 in Russia and in its regions.

Results. Among foreign migrant citizens, the incidence rates were higher than the Russian average: 1.5–2.0 times before 2020, and 4 times in 2021 and 2022. The proportion of registered cases of syphilis among foreign citizens in 2021 was 36.4%, significantly exceeding this figure not only in 2020 (18.2%), but also in previous years (16.7–21.2%). An increase in the number of foreign citizens with syphilis was observed in 2021 in all federal districts of the Russian Federation, while the number of syphilis cases detected in this contingent of people varied significantly between different regions of the Russian Federation. The main share (98.1%) in the structure of syphilis detected in foreign citizens was latent forms of the disease.

Conclusions. The high level of detection of syphilis in foreign migrant citizens and the predominance of latent forms of the disease in this population represent a potential epidemiological danger of the spread of infection. In connection with the current situation, it seems necessary to develop and implement permanent and controlled algorithms for monitoring STIs in risk groups, including foreign migrant citizens.

Keywords: syphilis, morbidity, migrants, sexually transmitted infections, STIs

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: Rakhmatulina M.R., Briko N.I., Novoselova E.Yu., Lopukhov P.D. The increase in the incidence of syphilis in the Russian Federation: foreign migrant citizens as a risk group for the spread of the disease. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):454–461.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-382>

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

Введение

Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения, ежегодно 374 млн людей в возрасте 15–49 лет заболевают четырьмя излечимыми инфекциями, передаваемыми половым путём (ИППП): сифилисом, хламидийной и гонококковой инфекциями, уrogenитальным трихомониазом. Столь же высокую распространённость имеют ИППП вирусного происхождения: 500 млн человек инфицированы вирусом простого герпеса 2-го типа, а около 300 млн женщин — вирусом папилломы человека¹.

Заболееваемость ИППП оказывает серьёзное влияние на здоровье и жизнь детей, подростков и взрослого населения: сифилис во время беременности ежегодно становится причиной более чем 300 тыс. случаев смерти плода и новорождённых; гонококковая инфекция и хламидиоз могут приводить к развитию бесплодия; инфицирование ИППП

значительно повышает риск заражения ВИЧ-инфекцией (для некоторых групп — в 2–3 раза); рак шейки матки, ассоциированный с вирусом папилломы человека, ежегодно приводит к 342 тыс. случаев летального исхода².

На протяжении предыдущего столетия в России регистрировалось несколько «эпидемических волн» заболеваемости ИППП и, по данным официального статистического наблюдения, последний пик заболеваемости ИППП наблюдался в 1990–2000-х гг., когда её показатели достигали 1361,2 случая на 100 тыс. населения, а показатель заболеваемости сифилисом — 277,3 случая на 100 тыс. населения. С 1999 по 2020 г. регистрировалось стабильное ежегодное снижение заболеваемости ИППП. Так, в 2020 г. снижение показателя заболеваемости сифилисом по отношению к показателю 2015 г. составило 55,7% [1, 2].

В период каждой «эпидемической волны» ИППП отмечалось формирование определённых

¹ WHO. Sexually transmitted infections (STIs). URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)) (дата обращения: 21.02.2023).

² WHO. Cervical cancer. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer> (дата обращения: 21.02.2023).

субпопуляций лиц — «ядерных» групп, представляющих социально уязвимые контингенты населения, склонные к рискованному поведению, но не желающие или не имеющие возможности снизить риск инфицирования: потребители инъекционных наркотиков, работники коммерческого секса, трудовые мигранты, заключённые, лица без определённого места жительства, беспризорные дети, подростки и др. Представители именно этих групп с высоким уровнем заражаемости сифилисом и другими ИППП в условиях периодически ухудшающихся социально-экономических условий становились источником очередного подъёма заболеваемости.

Сифилис, как и большинство ИППП, относится к социально значимым заболеваниям, при этом среди факторов, влияющих на распространение данной инфекции, особое место занимают миграционные процессы, в том числе трудовая миграция [3]. В России, и это характерно не только для нашей страны, число международных мигрантов за последние десятилетия постепенно увеличивалось [4]. По данным Главного управления по миграции МВД России, число прибывших в страну мигрантов за 2016–2022 гг. увеличилось на 17,5%, а число трудовых мигрантов за этот же период времени возросло практически в 3 раза (с 4,2 до 11,8 млн человек)³.

В связи с этим было проведено исследование, целью которого являлось изучение заболеваемости сифилисом у иностранных граждан-мигрантов в России и отдельных регионах государства за последние годы.

Материалы и методы

Для ретроспективного анализа заболеваемости ИППП использовали данные официальной статистики по материалам форм федерального статистического наблюдения № 9 «Сведения о заболевании инфекциями, передаваемыми половым путём, и заразными кожными болезнями» и № 34 «Сведения о больных заболеваниями, передаваемыми преимущественно половым путём, грибковыми кожными болезнями и чесоткой» в России и на отдельных территориях за 2011–2022 гг. Для расчёта показателя заболеваемости сифилисом среди иностранных граждан-мигрантов использовали официальные статистические сведения Главного управления по миграции МВД России⁴ с 2015 по 2022 г., при этом за основу принимались сведения о количестве фактов постановки на миграционный учёт иностранных граждан за каждый рассматриваемый год. Из 17 субъектов РФ были получены сведения о выяв-

ленных формах заболевания сифилисом среди иностранных граждан-мигрантов за 2021 г.

Выполнен ретроспективный анализ заболеваемости во времени и пространстве — в разрезе федеральных округов (ФО) и субъектов РФ. Описательный этап исследования включал расчёт интенсивных и экстенсивных показателей заболеваемости.

Оценка многолетних тенденций динамики заболеваемости выполнена методом наименьших квадратов. Для статистической обработки полученных результатов использовали программу «IBM SPSS V26.0», для визуализации данных — «Microsoft Excel 2016». Характер распределения признаков оценивали с помощью W -критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределение признаков имело ненормальный характер, далее использовали непараметрический критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. Проведены расчёты 95% доверительных интервалов (95% ДИ) показателей заболеваемости. Критический уровень значимости принимался $p < 0,05$.

Результаты

В 2021 г. в России впервые за последние годы отмечен рост заболеваемости сифилисом (на 39,4% по сравнению с 2020 г.), который продолжился и в 2022 г. В 2011–2019 гг. заболеваемость снижалась с 37,6 (95% ДИ 37,3–38,0) до 15,1 (95% ДИ 14,8–15,3) на 100 тыс. населения. В 2020 г. снижение было более выражено, показатель составил 10,4 (95% ДИ 10,3–10,6) на 100 тыс. населения (**рис. 1**). При этом среди иностранных граждан-мигрантов уровни заболеваемости были выше, чем в целом по РФ: до 2020 г. — в 1,5–2,0 раза, а в 2021 и 2022 гг. — в 4 раза ($p < 0,0001$).

При анализе структуры заболеваемости сифилисом установлено, что увеличение числа случаев сифилиса в 2021 и 2022 гг. было во многом обусловлено ростом данного значения среди иностранных граждан: с 2801 случая в 2020 г. до 7710 и 12 748 случаев в 2021 и 2022 гг. соответственно. Доля зарегистрированных случаев сифилиса у иностранных граждан в 2021 г. составила 36,4% от общего числа, значительно превысив данный показатель не только в 2020 г. (18,2%), но и в предыдущие годы (16,7–21,2%). В целом можно констатировать, что число случаев сифилиса, зарегистрированных у иностранных граждан, и его доля в общей структуре заболевания в 2021–2022 гг. значительно превысили данные показатели последних 10 лет (**рис. 2**).

Увеличение числа выявленных случаев сифилиса у иностранных граждан наблюдалось во всех ФО РФ: в Центральном — в 3,0 раза, в Северо-Западном — в 2,7 раза, в Южном — в 1,8 раза, в Северо-Кавказском — в 3,4 раза, в Приволжском — в 1,5 раза, в Уральском — в 3,1 раза, в Сибирском — в 2,4 раза, в Дальневосточном — в 2,3 раза.

³ Министерство внутренних дел Российской Федерации. Статистические сведения по миграционной ситуации. URL: <https://мвд.рф/dejatelnost/statistics/migracionnaya> (дата обращения: 21.02.2023).

⁴ Там же.

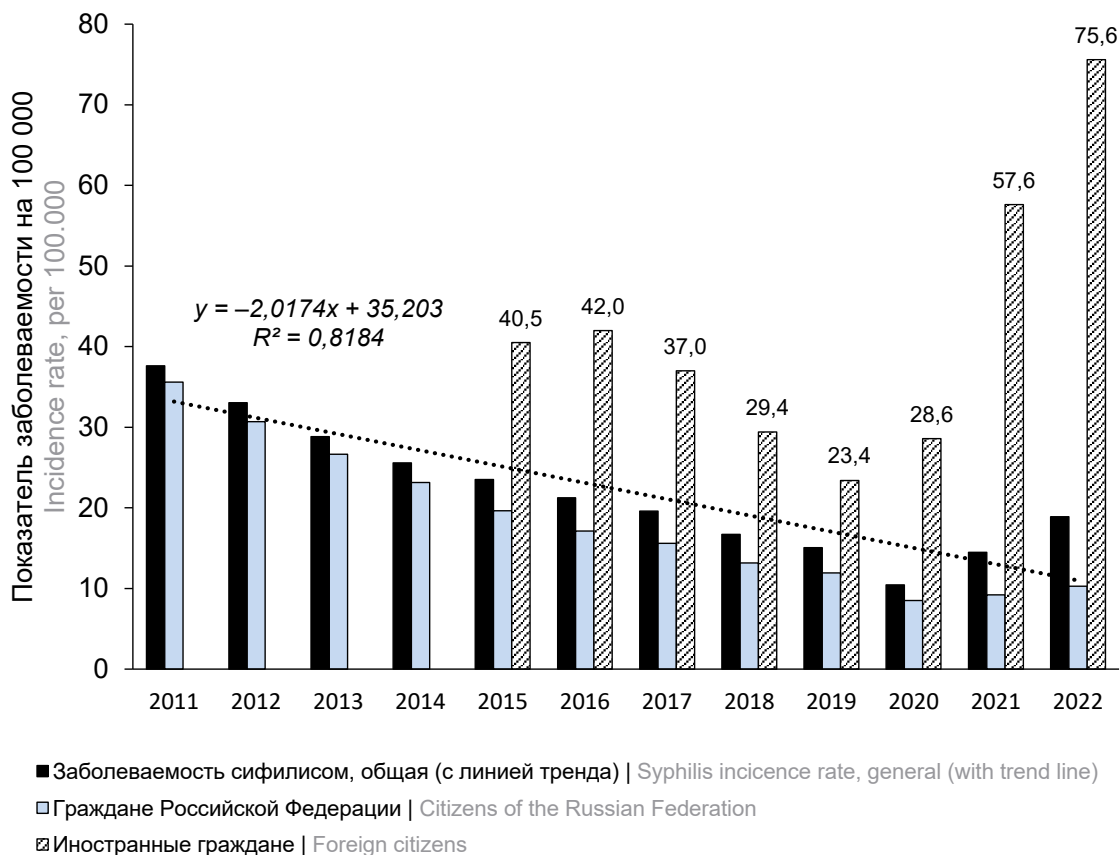


Рис. 1. Заболеваемость сифилисом в России в 2011–2022 гг.
Fig. 1. Syphilis incidence rates in the Russian Federation, 2011–2022.



Рис. 2. Число случаев сифилиса, зарегистрированных среди граждан Российской Федерации и иностранных граждан-мигрантов (абс.), и их доля в общей структуре заболевания (%) в 2011–2022 гг.
Fig. 2. The number of cases of syphilis registered among citizens of the Russian Federation and foreign migrant citizens (absolute numbers) and their share in the overall disease burden (%), 2011–2022.

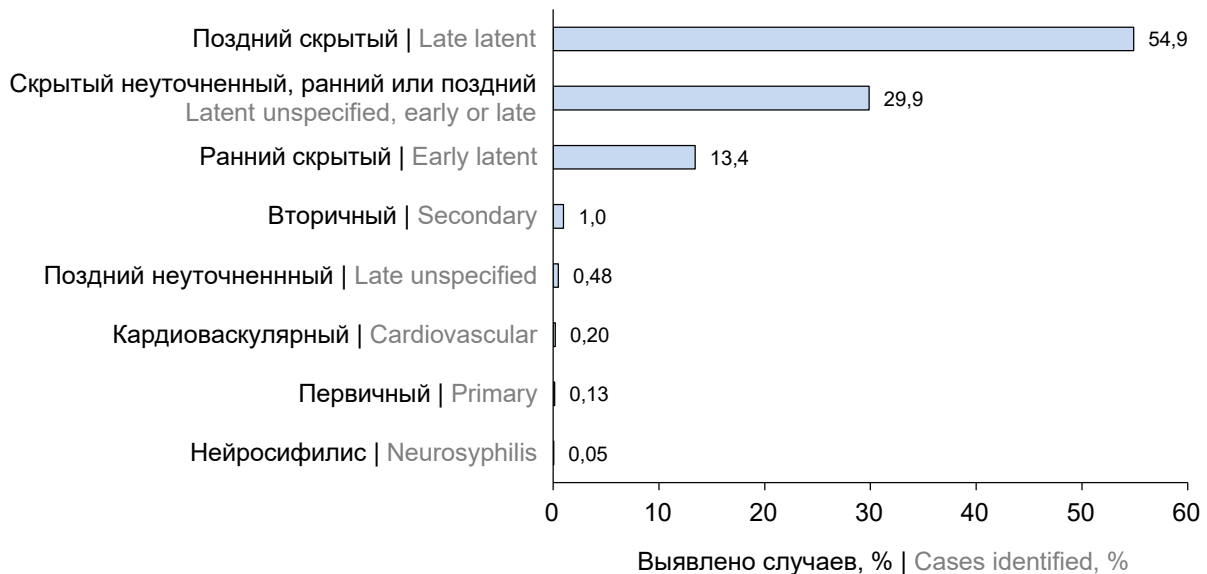


Рис. 3. Формы сифилиса, выявленные у иностранных граждан-мигрантов в 2021 г. (выявлено случаев, %).

Fig. 3. Forms of syphilis detected in foreign migrant citizens in 2021 (cases identified, %).

При этом количество выявленных случаев сифилиса у данного контингента лиц значительно варьировало в субъектах РФ.

При анализе данных, полученных из медицинских организаций дерматовенерологического профиля 17 субъектов РФ в 2021 г., установлено, что ранние формы сифилиса были выявлены у 878 (14,5%) из 6049 иностранных граждан, поздние формы — у 3365 (55,6%) иностранных граждан; у 1806 (29,9%) граждан был диагностирован сифилис скрытый неуточнённый, ранний или поздний. Значительная часть неуточнённых форм сифилиса объясняется отсутствием готовности данной категории лиц нести дополнительную финансовую нагрузку, необходимую для обследования в медицинских организациях дерматовенерологического профиля. Формы сифилиса с клиническими проявлениями (первичный, вторичный, кардиоваскулярный, поздний неуточнённый сифилис, нейросифилис) были выявлены у 114 (1,9%) обследованных лиц. Таким образом, основную долю (98,1%) в структуре сифилиса, выявленного у иностранных граждан, составили скрытые формы заболевания (5935 случаев) (рис. 3).

После установления диагноза 1341 (22,2%) иностранным гражданам было проведено лечение сифилиса в медицинских организациях дерматовенерологического профиля, 259 (4,3%) граждан отказались от лечения, их документы были направлены в Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на депортацию, а 4449 (73,5%) граждан были направлены на лечение по месту регистрации (при этом в медицинских организациях дерматовенерологического профиля отсутствует информация о проведённом лечении).

Обсуждение

Одной из эпидемиологически значимых в отношении ИППП «ядерных» групп являются иностранные граждане — мигранты. Рабочая сила во все времена и во всех государствах является тем институтом, за счёт которого развиваются экономическая, политическая и социальные сферы общества, и в силу различного рода факторов количество мигрантов с каждым годом постоянно увеличивается. Основные причины широкого распространения трудовой миграции: сложная политическая обстановка в родной стране, плохая экономика, в том числе низкий уровень заработных плат, социальных выплат, высокая инфляция, высокая стоимость товаров и продуктов первой необходимости, межнациональные конфликты, гонения, перенаселение государства и др. [5].

По итогам 2021 г., несмотря на связанные с пандемией ограничения на передвижение, число мигрантов и беженцев в мире достигло рекордной отметки. В целом за 50 лет число международных мигрантов увеличилось более чем в 3 раза; с 84 млн человек в 1970 г. до 153 млн человек в 1990 г., 221 млн человек в 2010 г., 281 млн человек в 2020 г. [6].

Россия входит в пятёрку мировых лидеров как по числу мигрантов, так и по числу граждан страны, проживающих за рубежом⁵. По данным Главного управления по миграции Министерства внутренних дел России, за 2016–2021 гг. количество трудовых мигрантов увеличилось более чем в 2 раза, а доля трудовых мигрантов за 2016–2019 гг. находилась в

⁵ Тюрюканова Е.В. Трудовая миграция в Россию. Электронная версия бюллетеня «Население и общество». URL: <https://polit.ru/article/2008/01/21/demoscope315/> (дата обращения: 21.02.2023).

пределах 28–31% от общего числа прибывших иностранных граждан. В 2021 г. поток трудовых мигрантов вырос более чем в 2 раза и составил 71% от общего числа поставленных на миграционный учёт иностранных граждан. За 2021 г. на миграционный учёт было поставлено свыше 13 млн иностранных граждан и лиц без гражданства, а поскольку граждане стран Евразийского экономического союза — Армении, Белоруссии, Казахстана и Киргизии — могут работать в России без оформления разрешений на работу или патентов, а некоторые иностранные граждане работают без оформления разрешительных документов, то общая численность международных трудовых мигрантов в России существенно выше, чем показывают данные текущего учёта.

Среди иностранных работников, прибывших в Россию в 2016–2021 гг., преобладали выходцы из Узбекистана, Таджикистана и Киргизии. Из общего числа лиц, поставленных на миграционный учёт по месту пребывания, 74% въехали в Россию с целью работы, 5% — с целью учёбы, 2% — с целью туризма, 19% — с частными или иными целями. Российскими регионами, наиболее привлекавшими мигрантов в период 2016–2021 гг., являлись Центральный и Северо-Западный ФО, куда мигрировали более 60% иностранных граждан.

На современном этапе миграционные потоки носят временный трудовой характер с преобладанием в их структуре выходцев из малых городов и сел, которые до выезда на работу в Россию не имели стабильной занятости на родине, а половина из них относились к группе крайне бедных, что оказывает влияние в том числе на их поведенческие особенности⁶.

Большинство исследователей едины во мнении, что иностранные граждане — трудовые мигранты являются составляющей частью так называемой «ядерной» группы, которая поддерживает высокий уровень заболеваемости ИППП, в том числе сифилисом [7]. Высокая заболеваемость сифилисом среди мигрантов обусловлена повышенным уровнем рискованного сексуального поведения, низким уровнем информированности об ИППП, ограничением доступа к медицинским услугам и профилактическим программам на бесплатной основе [8]. Данная проблема изучена недостаточно, однако опыт подобных исследований имеется. Так, Н.Я. Щербак и соавт., проанализировав опыт г. Санкт-Петербурга в отношении медицинского освидетельствования иностранных граждан и лиц без гражданства в 2010–2013 гг., отметили, что показатели заболеваемости ВИЧ-инфекцией, туберкулёзом и ИППП (в основном сифилисом) у ино-

странных граждан в 1,5 раза превышают таковые у жителей города [9].

Анализ результатов исследований (в основном зарубежных), посвящённых заболеваемости социальными инфекциями, в том числе ИППП, в различных странах мира, также подтверждает, что частота выявляемости данных заболеваний у мигрантов выше, чем у местных жителей: интенсивные показатели заболеваемости сифилисом мигрантов в 2–29 раз превышают общую заболеваемость и находятся в диапазоне от 243 до 1877 случаев на 100 тыс. обследуемых. Кроме того, исследователи обращают внимание на высокий удельный вес поздних форм сифилиса среди данного контингента лиц [10, 11].

Основные принципы российской миграционной политики закреплены в Указе Президента РФ «О концепции государственной миграционной политики Российской Федерации на 2019–2025 годы». Прежде всего миграционная политика страны ориентирована на повышение качества жизни граждан и обеспечение безопасности государства. Согласно этому документу миграция является дополнительным способом решения демографических и экономических проблем. При этом актуальным остаётся вопрос, связанный с медицинским обеспечением мигрантов. Контроль за влиянием миграционных потоков на эпидемиологическую ситуацию по социально значимым заболеваниям возложен законодательством на различные службы и ведомства в субъектах РФ. Однако разработка медико-организационной технологии, способствующей эффективному взаимодействию заинтересованных служб и ведомств с целью оперативного реагирования и принятия управленческих решений, способствующих снижению заболеваемости, в том числе сифилисом, остаётся актуальной [12].

К основным факторам повышенного риска заражения ИППП среди мигрантов можно отнести оторванность от привычного социума, уклада жизни и семьи и, как следствие, — состояние длительного стресса, неустойчивость правового положения в стране пребывания, практика употребления инъекционных наркотиков, промискуитетное поведение, низкий уровень знаний об ИППП. Высокая заболеваемость сифилисом среди трудовых мигрантов в числе прочих обусловлена ограничением доступа к медицинским услугам и профилактическим программам на бесплатной основе. Полученные нами данные указывают на значительный риск распространения сифилиса и других ИППП у данной категории лиц. Высокий процент поздних и неуточнённых форм заболевания (85,5%) свидетельствует о том, что мигранты приезжают в страну, уже инфицированными сифилисом. При этом основную долю (98,1%) в структуре сифилиса, выявленного у иностранных граждан, составляют скрытые формы за-

⁶ International Organization for Migration. World migration report 2022. P. 2. URL: <https://publications.iom.int/books/worldmigration-report-2022> (дата обращения: 21.02.2023).

болевания, что представляет собой потенциальную эпидемиологическую опасность его распространения. Обращает на себя внимание и отсутствие информации о проведенном лечении у 73,5% больных сифилисом, что также может негативно сказываться на распространении заболевания.

Заключение

Высокий уровень заболеваемости сифилисом у иностранных граждан-мигрантов и преобладание в его структуре скрытых форм заболевания представляют потенциальную эпидемиологическую опасность распространения инфекции. Уровни заболеваемости сифилисом среди иностранных граждан-мигрантов в последние 2 года в 4 раза превосходят аналогичные показатели среди граждан РФ. В связи со сложившейся ситуацией представляются необходимыми разработка и внедрение постоянно действующих и контролируемых алгоритмов мониторинга сифилиса и других ИППП в «ядерных» группах, в том числе среди иностранных граждан-мигрантов. Они должны объединяться с программами по другим социально значимым заболеваниям (ВИЧ, туберкулез и др.) и интегрироваться в общую систему здравоохранения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е. Динамика изменений интенсивных показателей заболеваемости инфекций, передаваемым половым путем, в оценке эпидемиологического процесса и состояния здоровья населения Российской Федерации за 2006–2016 годы. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2018;94(1):27–37. Kubanova A.A., Kubanov A.A., Melekhina L.E., et al. Dynamics of incidence of sexually transmitted infections in the evaluation of the epidemiological process and state of health of the Russian Federation population in 2006–2016. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2018;94(1):27–37. DOI: <https://doi.org/10.25208/0042-4609-2018-94-1-27-37> EDN: <https://elibrary.ru/orkhqk>
- Какорина Е.П., Залевская О.В., Голубева Н.А., Огрызко Е.В. Динамика инфекционной заболеваемости в Российской Федерации за 2000–2020гг. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики*. 2022;(5):65–93. Kakorina E.P., Zalevskaya O.V., Golubev N.A., Ogryzko E.V. Dynamics of infectious morbidity in the Russian Federation for 2000-2020. *Current Problems of Health Care and Medical Statistics*. 2022;(5):65–93. DOI: <https://doi.org/10.24412/2312-2935-2022-5-65-93>
- Лифшиц М.Л., Неклюдова Н.П. Влияние международной и внутренней миграции на распространение некоторых инфекционных заболеваний и наркомании в регионах РФ. *Экономика региона*. 2019;15(4):1184–98. Lifshits M.L., Neklyudova N.P. The impact of the external and internal migration on the prevalence of some infectious diseases and drug addiction in the Russian regions. *Economy of Regions*. 2019;15(4):1184–98. DOI: <https://doi.org/10.17059/2019-4-17> EDN: <https://elibrary.ru/soхунw>
- Аббосхонова Н.А. Новые тенденции в миграционных процессах в условиях глобализации. *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*. 2022;(2-1):132–34. Abboskhonova N.A. New trends in migration processes in the conditions of globalization. *International Journal of Humanities and Natural Sciences*. 2022;(2-1):132–34. DOI: <https://doi.org/10.24412/2500-1000-2022-2-2-132-134> EDN: <https://elibrary.ru/yexapf>
- Фадеева А.В., Шереметьева А.К. Особенности трудовой деятельности на территории РФ мигрантов. *Право и государство: теория и практика*. 2022;(5):84–8. Fadeeva A.V., Sheremetyeva A.K. Features of labor activity in the territory of the Russian Federation of migrants. 2022;(5):84–8. DOI: https://doi.org/10.47643/1815-1337_2022_5_84 EDN: <https://elibrary.ru/tmzbgz>
- Андриченко Л.В., Масловская Т.С., Плюгина И.В. Государственное управление в сфере миграции: опыт Российской Федерации и Республики Беларусь. *Журнал зарубежного законодательства и сравнительного правоведения*. 2022;18(2):53–68. Andrichenko L.V., Maslovskaya T.S., Plyugina I.V. State administration of migration sphere: the experience of the Russian Federation and the Republic of Belarus. *Journal of Foreign Legislation and Comparative Law*. 2022;18(2):53–68. DOI: <https://doi.org/10.12737/jflcl.2022.023> EDN: <https://elibrary.ru/tihqz>
- Кунгуров Н.В., Уфимцева М.А., Шакуров И.Г. и др. Эпидемиологические и социальные аспекты заболеваемости сифилисом, приоритетные задачи по предотвращению дальнейшего распространения инфекции. Екатеринбург; 2008. Kungurov N.V., Ufimceva M.A., Shakurov I.G., et al. *Epidemiological and Social Aspects of the Incidence of Syphilis, Priority Tasks to Prevent Further Spread of Infection*. Ekaterinburg; 2008. EDN: <https://elibrary.ru/vyequt>
- Уфимцева М.А., Малишевская Н.П., Сырнева Т.А. Клинико-эпидемиологические особенности сифилиса на территориях Урала, Сибири и Дальнего Востока. *Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии*. 2009;2(2):68–73. Ufimtseva M.A., Malishevskaya N.P., Syrneva T.A. Clinicoepidemiological features of syphilis in Ural, Siberia and Far East regions. *Modern Problems of Dermatovenerology, Immunology and Medical Cosmetology*. 2009;2(2):68–73. EDN: <https://elibrary.ru/mwxcxm>
- Щербак Н.Я., Улюкин И.М. Опыт организации медицинского освидетельствования иностранных граждан и лиц без гражданства в условиях мегаполиса. *Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2014;9(2):481–8. Shcherbak N.Ya., Ulyukin I.M. Experience of medical examination management of foreign citizens and stateless persons in the megapolis. *Health – the Base of Human Potential: Problems and Ways to Solve Them*. 2014;9(2):481–8. EDN: <https://elibrary.ru/vqdjaf>
- Струин Н.Л., Шубина А.С. Социальные инфекции у мигрантов, факторы, способствующие заболеваемости: обзор литературы. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;(11-5):676–9. Struin N.L., Shubina A.S. Social infection of migrants, factors contributing to morbidity: a review. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2015;(11-5):676–9. EDN: <https://elibrary.ru/uzmssv>
- Таишева Л.А. *Медико-организационные технологии профилактики ВИЧ-инфекции среди уязвимых групп населения*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2009. Taisheva L.A. *Medical and organizational technologies of HIV infection prevention among vulnerable groups of the population*: Diss. Moscow; 2009.
- Куртева Е.Е. Заболеваемость социальными инфекциями мигрантов: правовое регулирование. *Международный журнал экспериментального образования*. 2016;(11-2):29–33. Kurteva E.E. The incidence of social infections of migrants: the legal regulation. *International Journal of Experimental Education*. 2016;(11-2):29–33. EDN: <https://elibrary.ru/wwvkh>

Информация об авторах

Рахматулина Маргарита Рафиковна — д.м.н., профессор, зам. директора Государственного научного центра дерматовенерологии и косметологии по организационно-аналитической работе, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3039-7769>

Брико Николай Иванович — д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана, Москва, Россия; зав. каф. эпидемиологии и доказательной медицины ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6446-2744>

Новоселова Елена Юрьевна — врач-методист научно-организационного отдела Государственного научного центра дерматовенерологии и косметологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1907-2592>

Лопухов Платон Дмитриевич[✉] — к.м.н., доцент каф. эпидемиологии и доказательной медицины ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, lopukhov_p_d@staff.sechenov.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0872-2214>

Вклад авторов: *Рахматулина М.Р.* — концепция и дизайн исследования, организация сбора и обработки материала, редактирование; *Брико Н.И.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Новоселова Е.Ю.* — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; *Лопухов П.Д.* — обработка материала, статистическая обработка, редактирование. 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 11.09.2023;
принята к публикации 25.11.2023;
опубликована 28.12.2023

Information about the authors

Margarita R. Rakhmatulina — D. Sci. (Med.), Professor, Deputy Director for organizational and analytical work, State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3039-7769>

Nikolay I. Briko — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the RAS, Director, F. Erisman Institute of Public Health, Moscow, Russia; Head, Department of epidemiology and evidence-based medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6446-2744>

Elena Yu. Novoselova — methodologist, Scientific and organizational department, State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1907-2592>

Platon D. Lopukhov[✉] — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of epidemiology and evidence-based medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, lopukhov_p_d@staff.sechenov.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0872-2214>

Author contribution: *Rakhmatulina M.R.* — concept and design of the study, organization of the collection and processing of material, editing; *Briko N.I.* — concept and design of the study, editing; *Novoselova E.Yu.* — collection and processing of material, statistical processing, writing the text; *Lopukhov P.D.* — material processing, statistical processing, editing. 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 11.09.2023;
accepted for publication 25.11.2023;
published 28.12.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-388>



Молекулярно-генетический мониторинг возбудителей холеры

Водопьянов А.С.[✉], Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П., Носков А.К.

Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Актуальность. Продолжающаяся пандемия холеры определяет актуальность разработки и совершенствования методик анализа данных полногеномного секвенирования (WGS) возбудителя холеры. Особую значимость это приобретает в свете стоящих задач по импортозамещению зарубежной продукции, в том числе программного обеспечения.

Цель исследования состояла в разработке методики молекулярно-генетического мониторинга возбудителей холеры с использованием онлайн-геоинформационной системы (ГИС) и анализе с её помощью штаммов, выделенных на территории России ранее.

Материалы и методы. В работе использованы данные WGS 2598 токсигенных (ctxAB*tcpA*) штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor, полученные непосредственно авторами на платформе «MiSeq» («Illumina»), и из базы данных NCBI. Программное обеспечение для анализа однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) разрабатывали на языках программирования Java и Python. Для визуализации дендрограммы использовали программу «Cytoscape». Разработку онлайн-ГИС осуществляли с использованием языков программирования HTML, JavaScript и PHP. В качестве ядра использовали свободно распространяемую библиотеку Leaflet, написанную на языке JavaScript. В качестве картографических данных использовали карты, полученные от сообщества OpenStreetmap.

Результаты и обсуждение. Созданы универсальный набор SNP и программное обеспечение для анализа данных WGS штаммов холерных вибрионов. Показано, что большинство штаммов распределяются между несколькими большими кластерами. Установлены наиболее близкородственные штаммы холерных вибрионов, изолированные на территории России с 2001 г. Создана онлайн-ГИС «Молекулярно-генетический мониторинг *V. cholerae*», позволяющая проводить выборку близкородственных штаммов непосредственно на электронной карте.

Заключение. Разработанная методика SNP-типирования и построенная на её основе ГИС являются полезными инструментами для анализа филогенетических связей между штаммами холерных вибрионов.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холера, однонуклеотидный полиморфизм, генотипирование, геоинформационная система, полногеномное секвенирование, разработка программного обеспечения

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: Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П., Носков А.К. Молекулярно-генетический мониторинг возбудителей холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):462–471.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-388>

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

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-388>

Development of a methodology for molecular genetic monitoring for the cholera causative agent

Alexey S. Vodopyanov[✉], Sergey O. Vodopyanov, Ruslan V. Pisanov, Igor P. Oleinikov, Aleksey K. Noskov

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Background. The ongoing cholera pandemic determines the relevance of the development and improvement of methods for analysis of data on genome-wide sequencing of the cholera pathogen. This is of particular importance in the light of the challenges of import substitution of foreign products, including software.

The aim of the study was to develop a methodology for molecular genetic monitoring for the cholera causative agent using online geographic information system (GIS) and analysis with its help of strains isolated in Russia earlier.

Materials and methods. Data from genome-wide sequencing of 2598 toxigenic (ctxAB+tcpA+) strains of *V. cholerae* O1 El Tor, both obtained by the authors on the MiSeq (Illumina) platform, and retrieved from the NCBI database were used in the study. The SNP analysis software was developed in the Java and Python programming languages. Cytoscape program was used to visualize the dendrogram. The development of online GIS was carried out using the programming languages HTML, JavaScript and PHP. The freely distributed Leaflet library written in JavaScript was used as the core. Maps obtained from the OpenStreetMap community were used as cartographic data.

Results and discussion. A universal set of SNPs and software have been developed to analyze the data of genome-wide sequencing of cholera vibrio strains. It was shown that the majority of strains were distributed among several large clusters. The most closely related strains for cholera vibrios isolated in Russia since 2001 have been identified. An online GIS "Molecular genetic monitoring for *V. cholerae*" has been created, which allows the recognition of closely related strains directly on an electronic map.

Keywords: *Vibrio cholerae*, cholera, SNP, genotyping, GIS, genome-wide sequencing, software development

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: Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Pisanov R.V., Oleinikov I.P., Noskov A.K. Development of a methodology for molecular genetic monitoring for the cholera causative agent. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):462–471.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-388>

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

Введение

Седьмая пандемия холеры, вызванная эпидемиологически значимыми штаммами *Vibrio cholerae* O1 El Tor, началась в 1961 г. и продолжается до сих пор, её эндемичные очаги сформированы на территории многих стран Азии и Африки. Индийский субконтинент является местом формирования нескольких вариантов *V. cholerae*, впоследствии распространившихся по всему миру. Территория России не является эндемичной по холере, все зарегистрированные случаи холеры имели завозное происхождение.

Геном возбудителя холеры чрезвычайно пластичен, что приводит к формированию штаммов с повышенной вирулентностью, где, помимо точечных мутаций в различных генах, отмечены различные виды делеций [1–3].

Интенсивное развитие молекулярно-генетических технологий значительно увеличило возможности секвенирования полных геномов бактериальных патогенов с параллельным созданием баз данных, в связи с чем филогенетический анализ является одним из часто используемых методов получения эпидемиологических интерпретаций на основе геномных данных патогенов [4]. Однако нет единого подхода к проведению анализа. Так, данные полногеномного секвенирования (WGS) были использованы при анализе крупной вспышки холеры в Йемене в 2016–2017 гг., что позволило отнести выделяемые штаммы к одной из подлиний

7-й пандемической линии 7PET, которая произошла из Южной Азии и первоначально вызвала вспышки в Восточной Африке [5].

В ряде случаев, несмотря на наличие полных геномов, для проведения анализа используется ограниченное число генов. Так, при изучении штаммов холерных вибрионов O1-серогруппы, циркулирующих в Таиланде, было проведено типирование по однонуклеотидным полиморфизмам (single nucleotide polymorphism, SNP) 7 генов «домашнего хозяйства» (*adk*, *gyrB*, *metE*, *mdh*, *pntA*, *purM* и *pyrC*), что позволило провести дифференциацию клинических и водных изолятов O1 и O139, а также выявить вибрионы, относящиеся к другим серологическим группам [6]. При изучении генетического профиля штаммов *V. cholerae* O1, выделенных от больных холерой в Дакке и Бангладеш, был проведён филогенетический анализ на основе 4141 SNP, который позволил выявить близкое родство с эпидемическими клонами *V. cholerae* O1, выделенными в 2010 г. от больных холерой в Пакистане [7]. Т. Ramamurthy и соавт. проведено исследование 136 штаммов *V. cholerae* El Tor, выделенных в различных регионах мира, по 20 тыс. SNP, что позволило показать существование 8 филогенетических линий [8]. Анализ данных WGS широко используется и отечественными исследователями для выявления клональных связей между различными штаммами *V. cholerae* [9–11].

Большое значение имеет набор SNP, используемых для анализа. Как правило, он составляется во время проведения исследования для определённой группы анализируемых изолятов *V. cholerae*. Так, большинство работ посвящено одномоментному изучению ограниченных наборов штаммов [6, 7, 9, 11]. Это, с одной стороны, может являться причиной расхождения результатов даже при изучении геномов одних и тех же штаммов, с другой стороны, такой подход ограничивает возможности проведения постоянного мониторинга с оперативным включением в анализ выделяемых штаммов *V. cholerae* [12]. На наш взгляд, это делает актуальным разработку методик, основанных на использовании единого перечня SNP, что позволит повысить оперативность проведения анализа при выделении свежих штаммов. Стоит отметить, что подобный подход, предусматривающий анализ по заранее определённому перечню SNP, уже с успехом реализован для возбудителя сибирской язвы [13–15] и туляремии [16, 17].

Одной из задач исследователей в нашей стране является импортозамещение, что предусматривает преодоление зависимости от импортных поставок программных средств и использование преимущественно отечественного программного обеспечения¹. Это подчёркивает актуальность разработки отечественных программных продуктов. Не менее актуальными проблемами являются анализ и визуализация получаемых результатов. Одним из наиболее часто используемых методов анализа является построение дендрограммы, отражающей филогенетические связи между различными штаммами *V. cholerae*. Однако, чем больше штаммов взято в исследование, тем более громоздкой получается итоговая дендрограмма, что осложняет проведение её анализа. Вместе с тем одним из универсальных инструментов анализа являются геоинформационные системы (ГИС), позволяющие комбинировать пространственные, временные и эпидемиологические данные. В настоящее время широко распространение получили онлайн-ГИС и интерактивные базы данных, размещаемые в сети Интернет, что обеспечивает возможность работы с ними широкому кругу исследователей [18–21].

В связи с этим **цель** настоящего исследования состояла в разработке методики молекулярно-генетического мониторинга за возбудителем холеры с использованием онлайн-ГИС и анализе с её помощью штаммов, выделенных ранее на территории России.

Материалы и методы

В работе использованы 220 токсигенных (*ctxAB⁺tcpA⁺*) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor из коллекции Музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института, секвенирование которых проведено на платформе «Illumina MiSeq». Для сравнительного анализа в работу были взяты 1848 геномов из базы данных NCBI и 530 геномов из базы ENA (European Nucleotide Archive), представленных в виде ридов, сборку которых проводили с использованием программы «Spades» [22].

Программное обеспечение для составления перечня SNP, проведения SNP-типирования и построения дендрограммы (минимальное остовное дерево) разрабатывали на языках программирования Java и Python.

Для визуализации дендрограммы использовали программу «Cytoscape» [23]. Геокодирование мест выделения штаммов проводили с использованием API-сервиса Nominatum. Разработку онлайн-ГИС осуществляли с использованием языков программирования HTML, JavaScript и PHP. В качестве ядра использовали свободно распространяемую библиотеку «Leaflet», написанную на языке JavaScript. В качестве картографических данных использовали карты, полученные от сообщества «OpenStreetmap».

Результаты и обсуждение

Первый этап работы заключался в создании коллекции геномов токсигенных (*ctxAB⁺tcpA⁺*) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. Для этой цели все имеющиеся данные WGS были проверены на наличие генов *wbe (rbfN)*, *tcpA*, *ctxA*, *ctxB*, что позволило отобрать 2598 геномов, выделенных с 1941 по 2022 г. (см. приложение в дополнительных файлах к статье на сайте журнала: DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-388-1>). При этом некоторые геномы *V. cholerae* O1 были дублированы в случае проведения секвенирования разными авторами на разных технологических платформах. Существенной сложностью на данном этапе явилось отсутствие полноценных данных о месте выделения штаммов. Для дальнейшего анализа были оставлены штаммы, для которых указаны год и место выделения.

Следующий этап работы состоял в составлении универсального перечня SNP, позволяющего проводить анализ данных WGS штаммов возбудителя холеры. Одной из значимых проблем при проведении подобных исследований является существенное возрастание требований производительности вычислительной мощности при увеличении количества исследуемых штаммов. С этой целью нами ранее был разработан алгоритм последовательного анализа геномов, при котором перечень SNP изучаемого штамма сохраняется в отдельном файле [12]. Это обеспечивает линейную зависимость времени

¹ Указ Президента РФ от 13.05.2017 № 208 «О Стратегии экономической безопасности Российской Федерации на период до 2030 года» и Указ Президента РФ от 07.05.2018 № 204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года»

работы от количества изучаемых штаммов, а также позволяет организовать многопоточность, т.е. проведение одновременного анализа сразу нескольких геномов. Помимо этого данный приём в совокупности с универсальным перечнем SNP даёт возможность экономить время при необходимости добавления новых штаммов в анализ.

Для составления перечня SNP в рамках настоящей работы был проведён анализ случайной выборки из 50 геномов *V. cholerae* из базы данных NCBI, выделенных в период с 2016 по 2020 г., что позволило составить единый перечень, включающий данные о 54 858 SNP.

Следующий этап заключался в построении матрицы различий, основанной на попарном сравнении изучаемых штаммов. При этом каждый вариант SNP учитывался для дальнейшего анализа только в случае наличия такого же аллеля как минимум у 3 штаммов, что позволяет исключать ошибки секвенирования. Сложностью данного этапа является квадратичная зависимость времени от количества штаммов. В зависимости от мощности используемого компьютера данный этап составлял 12–72 ч.

Для анализа полученной информации было построено минимальное остовное дерево, отражающее генетическую близость между различными группами штаммов (рис. 1). Для облегчения визуального анализа штаммы *V. cholerae* O1, изолированные в России, отмечены красным цветом, на Украине — зелёным.

Технологические платформы секвенирования различаются по характеру генерируемых ошибок. Например, при использовании технологии «MiSeq» («Illumina») ошибки секвенирования чаще всего проявляются в виде единичных нуклеотидных замен, в то время как для «Ion Torrent» больше были характерны делеции-вставки [24]. Это может являться существенной проблемой при сравнительном анализе данных, полученных разными авторами. Для решения этой проблемы ранее нами был предложен метод «контрольных геномов», заключающийся в добавлении в анализ одних и тех же штаммов, сиквенс которых проведён на различных типах секвенаторов [24]. В рамках настоящего исследования в анализ были включены пары геномов штаммов *V. cholerae* O1 El Tor № 81 и № 18899,

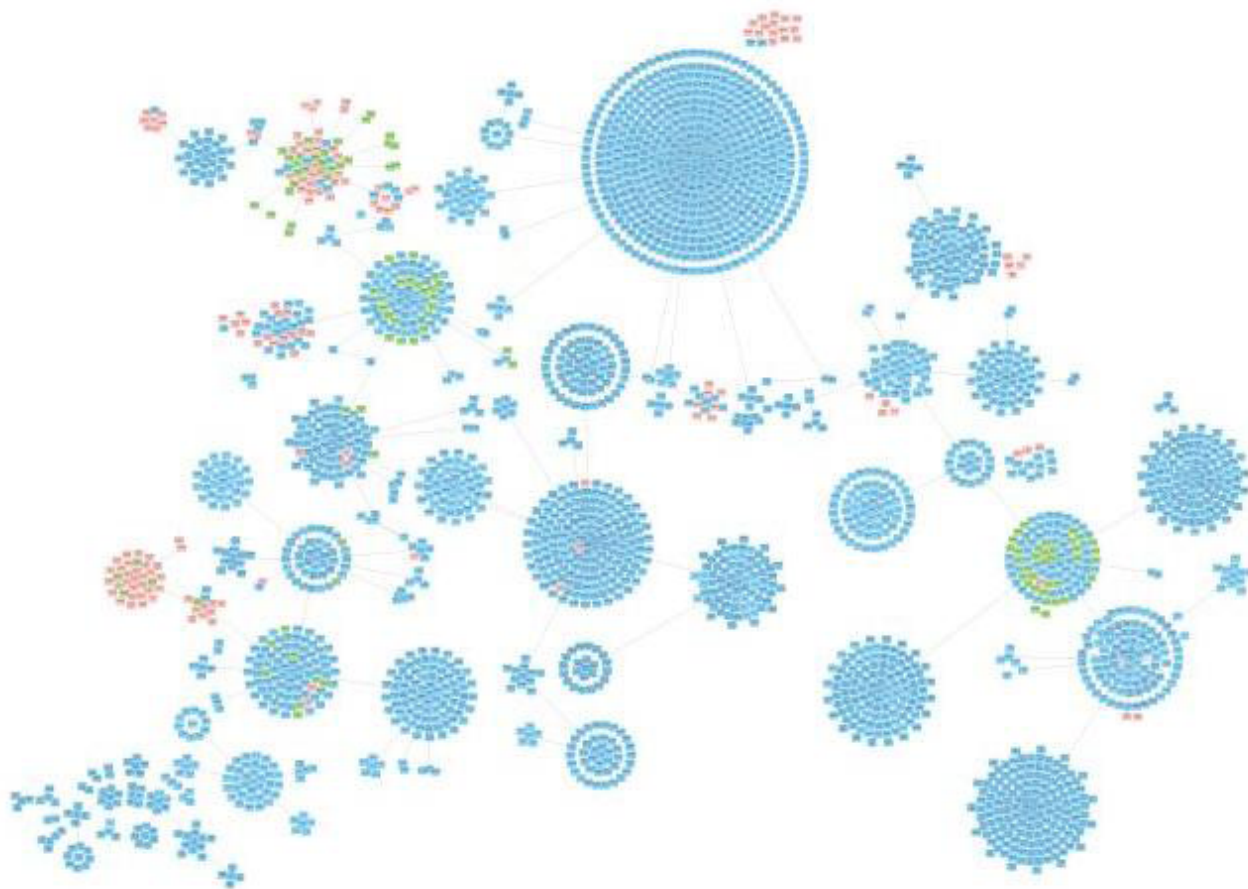


Рис. 1. Дендрограмма, отражающая генетическую близость между 2598 геномами токсигенных штаммов *V. cholerae* O1-серогруппы.

Fig. 1. Dendrogram reflecting the genetic affinity between 2598 genomes of toxigenic strains of *V. cholerae* O1 serogroup.

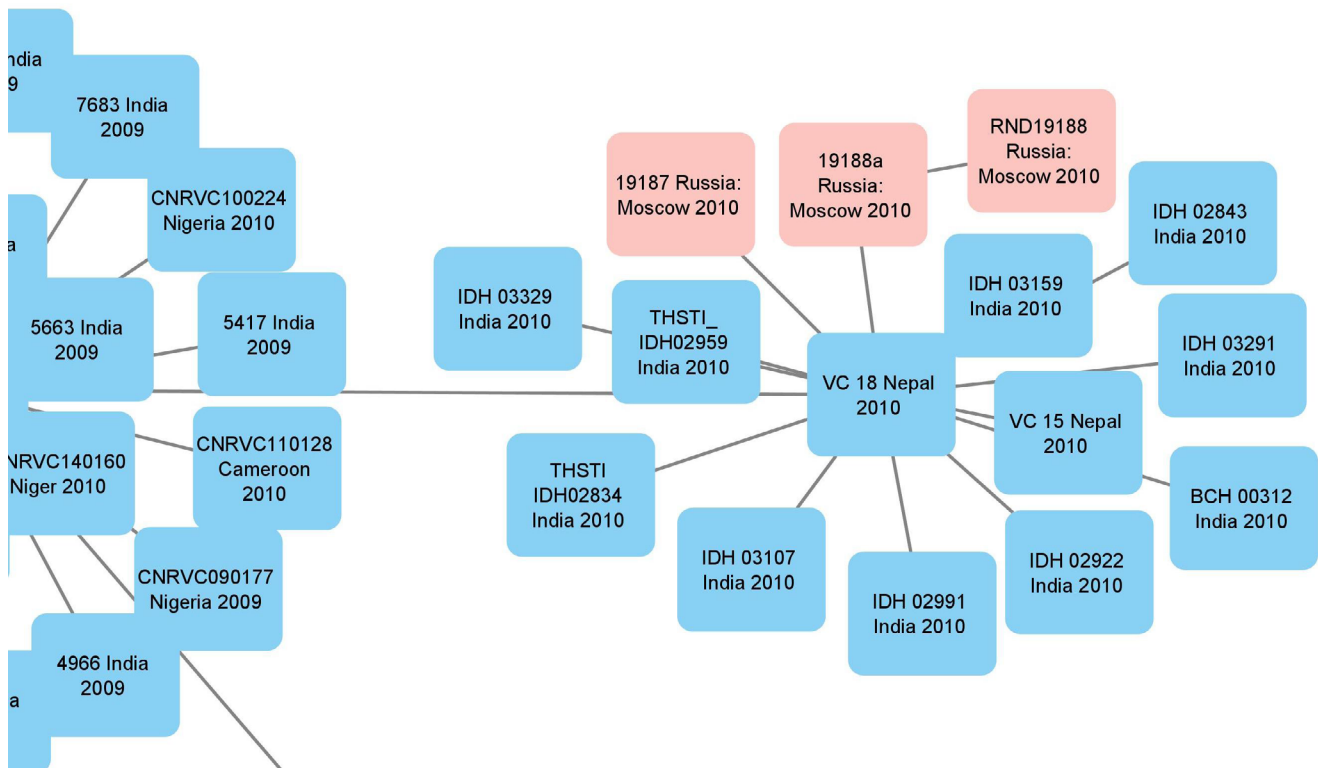


Рис. 2. Фрагмент дендрограммы, отражающей близость штаммов *V. cholerae*, выделенных в Москве, к штаммам из Индии и Непала. Для каждого штамма указаны номер штамма, место и год выделения.

Fig. 2. Fragment of a dendrogram reflecting the relatedness of *V. cholerae* strains isolated in Moscow to strains from India and Nepal. For each strain, the strain number, place and year of isolation are indicated.

секвенирование каждого из которых проведено на платформах «MiSeq» («Illumina») и «IonTorrent» («Thermo Fisher»). Парная группировка таких штаммов, на наш взгляд, доказывает корректность построенной дендрограммы.

Анализ дендрограммы показывает, что основная масса токсигенных изолятов *V. cholerae* распределяется между несколькими большими кластерами. Наибольший интерес, на наш взгляд, представляет анализ штаммов, изолированных в России. Геномы токсигенных штаммов *V. cholerae* № 19187, 19188 и 19188a, выделенные в Москве в 2010 г., оказались генетически близки штаммам, циркулировавшим в это же время в Индии и Непале (**рис. 2**). В то время как изоляты *V. cholerae* O1-серогруппы № 19191 и 19191a, также выделенные в Москве, оказались близки «гаитянской» группе штаммов, циркулировавших на о. Гаити в 2010 г., что согласуется с данными, полученными ранее [24].

Особый интерес представляют штаммы *V. cholerae*, вызвавшие вспышку холеры на Украине в 2011 г. Данные штаммы имеют «гаитянский» тип гена *ctxB* (*ctxB-7* по классификации [25]) и, по мнению ряда авторов, образуют общий кластер со штаммами, вызвавшими вспышку холеры на о. Гаити в 2010 г. [26]. Однако, по данным настоящего исследования, «украинские» штаммы образовали

отдельный кластер со штаммами, изолированными в Индии в 2010–2016 гг. В этот же кластер попал изолят *V. cholerae* № 6878, выделенный в Москве в 2012 г. (**рис. 3**). Примечательно, что данный кластер является дочерним от кластера штаммов, выделенных непосредственно на о. Гаити в 2010–2013 гг., что согласуется с данными, полученными К.В. Kuleshov и соавт. [27]. Это позволяет сделать вывод о продолжающихся мутационных изменениях в данной группе штаммов.

Весьма интересным представлялось изучение токсигенных штаммов, выделенных в Ростовской области в 2011 и 2014 гг., ввиду того что ранее проведенное исследование не позволило выявить близкородственные геномы [24]. В рамках настоящего исследования данные изоляты попали в общий кластер со штаммами, циркулировавшими в Мозамбике на протяжении более 10 лет. Кроме того, в этот же кластер вошли штаммы, изолированные в 2005 г. в Твери и Москве (**рис. 4**).

В ходе эпидемиологического расследования вспышки холеры (52 больных и 18 вибрионосителей) в Казани в 2001 г. было высказано предположение о завозе возбудителя из-за рубежа [28]. В рамках настоящего исследования установлено, что штаммы *V. cholerae*, выделенные во время вспышки в 2001 г., оказались генетически близки

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

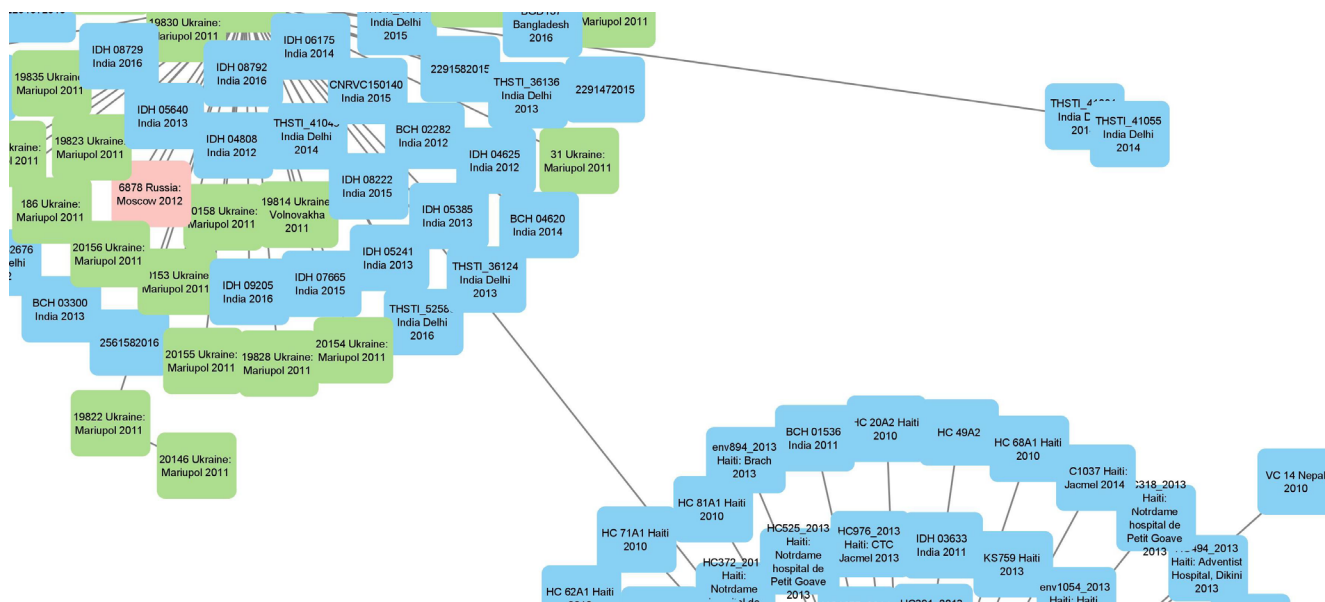


Рис. 3. Фрагмент дендрограммы, содержащий штаммы, изолированные во время вспышки холеры в Мариуполе в 2011 г.

Для каждого штамма указаны номер штамма, место и год выделения.

Fig. 3. A fragment of a dendrogram containing strains isolated during a cholera outbreak in Mariupol in 2011.

For each strain, the strain number, place and year of isolation are indicated.

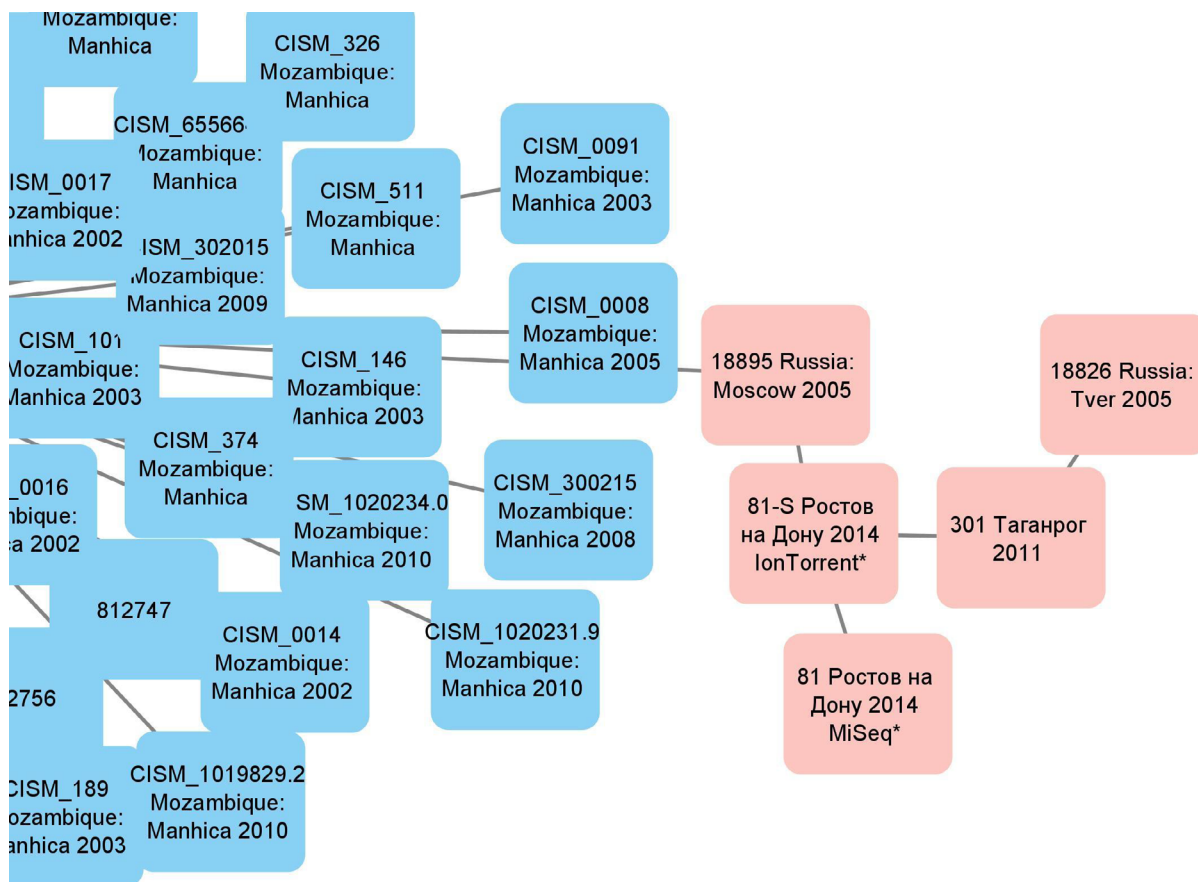


Рис. 4. Фрагмент дендрограммы, содержащий штаммы, изолированные в России в 2005–2014 гг.

Для каждого штамма указаны номер штамма, место и год выделения.

Fig. 4. A fragment of a dendrogram containing strains isolated in Russia in 2005–2014.

For each strain, the strain number, place and year of isolation are indicated.

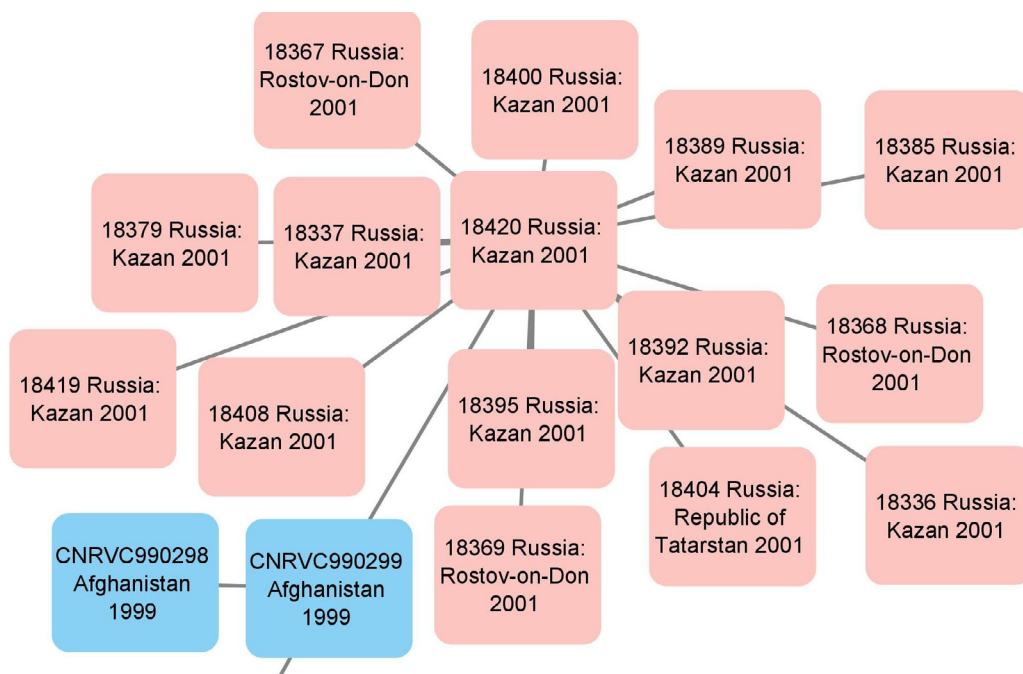


Рис. 5. Фрагмент дендрограммы, содержащей штаммы, изолированные в России в 2001 г.

Для каждого штамма указаны номер штамма, место и год выделения.

Fig. 5. Fragment of a dendrogram containing strains isolated in Russia in 2001.

For each strain, the strain number, place and year of isolation are indicated.

изолятам из Афганистана (**рис. 5**), а также штаммам, изолированным в Ростове-на-Дону (2001 г.). Примечательно, что близость между штаммами из Ростова-на-Дону и Казани уже была показана ранее по итогам VNTR-анализа [29, 30]

Актуальным, на наш взгляд, является сопоставление результатов изучения геномов *V. cholerae*, полученных различными авторами. В этом плане весьма интересна работа F.X. Weill и соавт., посвящённая изучению геномов вибрионов, изолированных на африканском континенте [31]. На основе байесовского анализа авторы выделили 12 волн

распространения холеры в Африке. Нам удалось сопоставить данные о принадлежности штамма к той или иной волне для 237 изолятов, взятых в наше исследование. При этом каждая из волн занимает от 1 до 4 кластеров, при этом отсутствуют кластеры, в который попадали бы штаммы из разных волн. На наш взгляд, это может свидетельствовать о хорошей сходимости результатов, полученных различными методами.

Следующий этап работы состоял в разработке онлайн-ГИС, содержащей данные о геномах токсигенных штаммов *V. cholerae* O1. С этой целью на-



Рис. 6. Внешний вид разработанной ГИС «Молекулярно-генетический мониторинг за *V. cholerae*».

Fig. 6. The appearance of the developed GIS "Molecular genetic monitoring for *V. cholerae*".



Рис. 7. Фрагмент ГИС «Молекулярно-генетический мониторинг *V. cholerae*» — штаммы, генетически близкородственные штамму *V. cholerae* № I-1330.

Fig. 7. The fragment of GIS "Molecular genetic monitoring for *V. cholerae*" — strains genetically closely related to *V. cholerae* strain I-1330.

ми были отобраны геномы вибрионов, для которых имелась информация о месте и дате их выделения (2598 геномов). После геокодирования с использованием сервиса Nominatum данные были нанесены на электронную карту (рис. 6). В случае изоляции нескольких штаммов в одной точке они автоматически группируются в единый пространственный кластер с отображением их количества. При нажатии на него отображаются все штаммы, входящие в такой кластер. Для фильтрации по времени выделения штаммов предусмотрена кнопка «Выборка по годам», позволяющая указать необходимый временной диапазон.

Для выборки и фильтрации штаммов на основе их генетической близости был создан серверный программный модуль, позволяющий выявлять генетически близкие варианты с помощью матрицы, построенной на предыдущем этапе. При нажатии на маркер штамма отображается диалоговое окно, содержащее краткую информацию о геноме и кнопку «Найти похожие», позволяющую выбрать все геномы, отличающиеся не более чем на 5 SNP. Для облегчения визуального анализа размер маркера отражает генетическую близость. Например, результат поиска близкородственных геномов штамма *V. cholerae* № I-1330, выделенного во Владивостоке в 1999 г., представлен на рис. 7. Стоит отметить, что наиболее генетически близкими данному штамму являются изоляты, выделенные в Китае, Камбодже

и Лаосе, что, в свою очередь, коррелирует с данными, полученными другими авторами [32].

Выводы

В ходе проведенного исследования отобраны 54 858 SNP, позволяющие дифференцировать эпидемиологически значимые штаммы, и создано программное обеспечение для проведения пакетного филогенетического анализа токсигенных штаммов *V. cholerae* на основе данных WGS.

Построена дендрограмма, отражающая филогенетические связи между 2598 геномами токсигенных изолятов *V. cholerae*. Показано, что большинство штаммов распределяются между несколькими большими кластерами. Установлено, что штаммы из Ростовской области (2011 и 2014 гг.) оказались близки к группе штаммов, длительно циркулировавших в Мозамбике. Изоляты *V. cholerae*, выделенные в Москве в 2010 г., представлены двумя разными кластерами, один из которых образован штаммами из Непала и Индии, в то время как второй представлен штаммами, вызвавшими вспышку холеры на о. Гаити в 2010 г. Установлено, что эпидемические осложнения вспышки холеры в г. Казани в 2001 г. вызваны штаммами, генетически близкородственными штаммам из Афганистана.

Создана онлайн-ГИС «Молекулярно-генетический мониторинг *V. cholerae*», позволяющая проводить выборку близкородственных штаммов непо-

средственно на электронной карте. ГИС расположена на сервере Ростовского-на-Дону противочумного института и доступна для работы сотрудникам учреждений Роспотребнадзора и других заинтересованных ведомств.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011;477(7365):462–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10392>
- Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А. и др. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014;69(7-8): 46–53. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., et al. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014;69(7-8):46–53. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109> EDN: <https://elibrary.ru/snhyar>
- 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> EDN: <https://elibrary.ru/sapflg>
- Didelot X., Siveroni I., Volz E.M. Additive uncorrelated relaxed clock models for the dating of genomic epidemiology phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(1):307–17. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa193>
- Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature*. 2019;565(7738):230–3. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
- Siriphap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., et al. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169324. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169324>
- Hossain Z.Z., Leekitcharoenphon P., Dalsgaard A., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Bangladesh. *Lett. Appl. Microbiol.* 2018;67(4):329–36. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.13046>
- Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., et al. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front. Public Health*. 2019;7:237. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00203>
- Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И., Заднова С.П. и др. Молекулярно-генетические свойства штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, циркулирующих на Африканском континенте. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017;35(1):12–9. Cheldyshova N.B., Smirnova N.I., Zadnova S.P., et al. Molecular-genetic properties of *Vibrio cholerae* El Tor strains circulating in Africa. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017;32(1):12–20. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416817010025> EDN: <https://elibrary.ru/prquyj>
- Миронова Л.В., Балахонov С.В. Полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов в изучении молекулярной эпидемиологии холеры и эволюционной истории возбудителя. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(4):10–8. Mironova L.V., Balakhonov S.V. Whole-genome analysis of single-nucleotide polymorphisms in study of cholera modular epidemiology and agent evolutionary history. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(4):10–8. EDN: <https://elibrary.ru/sjwhdz>
- Kuleshov K.V., Vodop'ianov 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>
- 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. Vodopianov A.S., Pisanov R.V., Vodopianov S.O., Oleynikov 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/ebllnh>
- Wang D., Wang B., Zhu L., et al. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis. *Microbiol. Res.* 2020;233:126414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126414>
- Zhang E., Zhang H., He J., et al. Genetic diversity of *Bacillus anthracis* Ames lineage strains in China. *BMC Infect. Dis.* 2020;20(1):140. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4867-5>
- Roonie A., Majumder S., Kingston J.J., Parida M. Molecular characterization of *B. anthracis* isolates from the anthrax outbreak among cattle in Karnataka, India. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):232. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01917-1>
- Kevin M., Girault G., Caspar Y., et al. Phylogeography and genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. holarctica in France (1947–2018). *Front. Microbiol.* 2020;11:287. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00287>
- Schütz S.D., Liechti N., Altpeter E., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies holarctica and epidemiology of tularemia in Switzerland. *Front. Microbiol.* 2023;14:1151049. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151049>
- Kamel Boulos M.N., Geraghty E.M. Geographical tracking and mapping of coronavirus disease COVID-19/severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) epidemic and associated events around the world: how 21st century GIS technologies are supporting the global fight against outbreaks and epidemics. *Int. J. Health Geogr.* 2020;19(1):8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12942-020-00202-8>
- Clarkson M.D. Web-based COVID-19 dashboards and trackers in the United States: survey study. *JMIR Hum. Factors*. 2023;10:e43819. DOI: <https://doi.org/10.2196/43819>
- Schmidt F., Dröge-Rothaar A., Rienow A. Development of a Web GIS for small-scale detection and analysis of COVID-19 (SARS-CoV-2) cases based on volunteered geographic information for the city of Cologne, Germany, in July/August 2020. *Int. J. Health Geogr.* 2021;20(1):40. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12942-021-00290-0>
- Samany N.N., Liu H., Aghataher R., Bayat M. Ten GIS-based solutions for managing and controlling COVID-19 pandemic outbreak. *SN Comput. Sci.* 2022;3(4):269. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42979-022-01150-9>
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19(5):455–77. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498–504. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О. и др. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* — разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016;21(3):146–52.

- Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Vodopyanov S.O., et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* — development of the algorithm for data analysis of whole genome sequencing. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2016;21(3):146–52. DOI: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152> EDN: <https://elibrary.ru/wbgjid>
25. 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>
26. Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В. и др. Генетическое типирование штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Кавказа в период 1970–1998 гг., с применением MLVA-5 и wgSNP. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(1):46–58. Kovalev D.A., Sharakov N.A., Pisarenko S.V., et al. Genetic typing of *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor isolated from the Caucasus region during the 1970–1998 period using MLVA-5 and wgSNP. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(1):46–58. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-29> EDN: <https://elibrary.ru/mlvbqj>
27. Kuleshov K.V., Kostikova A., Pisarenko S.V. et al. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011. *Infect. Genet. Evol.* 2016;44:471–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.039>
28. Онищенко Г.Г., Морозов В.В., Трифонов В.А. и др. Мероприятия по локализации и ликвидации вспышки холеры в Республике Татарстан. *Казанский медицинский журнал*. 2002;83(5):390–3. Onishchenko G.G., Morozov V.V., Trifonov V.A., et al. Measures on localization and control of cholera outbreak in Tatarstan Republic. *Kazan Medical Journal*. 2002;83(5):390–3. EDN: <https://elibrary.ru/hrtzer>
29. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М. и др. Мультилокусное VNTR-генотипирование культур холерных вибрионов, выделенных в г. Казань во время вспышки холеры летом 2001 г. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2003;(6):11–5. Mishankin B.N., Vodopyanov A.S., Lomov Yu.M., et al. Multilocus VNTR-genotyping of the cultures of *Vibrio cholerae* isolated in Kazan the outbreak of cholera in summer of 2001. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2003;(6):11–5. EDN: <https://elibrary.ru/wfngif>
30. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Водопьянов А.С. и др. Ретроспективный молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(4):33–41. Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Vodopyanov A.S., et al. Retrospective molecular-epidemiological analysis of cholera epidemic in the Republic of Dagestan in 1994. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(4):33–41. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-33-41> EDN: <https://elibrary.ru/xgxsxb>
31. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., et al. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science*. 2017;358(6364):785–9. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5901>
32. 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>

Информация об авторах

Водопьянов Алексей Сергеевич — к.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, vodopyanov_as@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Водопьянов Сергей Олегович — д.м.н., г.н.с. лаб. микробиологии холеры Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>

Писанов Руслан Вячеславович — к.б.н., зав. лаб. молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Олейников Игорь Павлович — н.с. лаб. микробиологии холеры Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>

Носков Алексей Кимович — к.м.н., директор Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Участие авторов: Водопьянов А.С. — автор идеи, разработка методики анализа, биоинформационный анализ, написание текста статьи; Водопьянов С.О. — анализ литературы, написание текста статьи, редактирование; Писанов Р.В. — биоинформационный анализ, написание текста статьи; Олейников И.П., Носков А.К. — написание текста статьи, редактирование. 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 01.10.2023;
принята к публикации 12.11.2023;
опубликована 28.12.2023

Information about the authors

Alexey S. Vodopyanov — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, vodopyanov_as@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Sergey O. Vodopyanov — D. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>

Ruslan V. Pisanov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Igor P. Oleynikov — researcher, Laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>

Aleksey K. Noskov — Cand. Sci. (Med.), Director, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Author contribution: Vodopyanov A.S. — author of the idea, development of the analysis methodology, bioinformatic analysis, writing the text of the article; Vodopyanov S.O. — literature analysis, writing the text of the article, editing; Pisanov R.V. — bioinformatic analysis, writing the text of the article; Oleynikov I.P., Noskov A.K. — writing the text of the article, editing. 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 01.10.2023;
accepted for publication 12.11.2023;
published 28.12.2023

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-401>



Оценка регистрируемого и скрытого эпидемического процесса клещевого энцефалита в Республике Карелия

Рубис Л.В.¹, Чевская В.Е.², Екимова О.В.², Сафонова О.С.²

¹Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

²Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия, Петрозаводск, Россия

Аннотация

Введение. Заболеваемость клещевым энцефалитом (КЭ) в России сохраняет актуальность. Оценка эпидемического процесса этой инфекции в Республике Карелия важна не только для понимания его общих закономерностей, но и в связи с ростом туристической посещаемости региона.

Цель: оценить современную эпидемическую ситуацию по КЭ в Республике Карелия, сопоставить характеристики регистрируемого и скрытого эпидемического процесса.

Материалы и методы. По данным учёта случаев обращения за медицинской помощью в связи с присасыванием клещей, результатов исследования заражённости клещей вирусом КЭ и эпидемиологического исследования случаев заболевания проанализированы риск заражения и заболеваемость в 1992–2022 гг. Клиническая, гендерная и возрастная структуры, территориальное распределение больных и пострадавших от клещей сопоставлены с результатами серологических исследований 2379 проб крови взрослого населения, проведённых в 2011–2022 гг.

Результаты. Заражённость клещей варьировала от 23,6–27,0% в 2002–2005 гг. до 1,0% в 2022 гг. В 2004 г. антиген вируса КЭ был выявлен в комарах. Территория риска — южная часть республики, но выявлен рост обращаемости в северных районах. Заболеваемость превышала среднефедеральные показатели, особенно в 2003–2004 гг. (15,3–11,6 на 100 тыс.). К 2021–2022 гг. она снизилась до 1,8–1,5 на 100 тыс. Динамика заболеваемости коррелировала с динамикой обращаемости и заражённости клещей ($R = 0,92$ и $0,73$). Регистрируемая заболеваемость ниже расчётного показателя риска заражения. Наиболее часто диагностировали менингеальные формы. Риск заболевания выше у лиц пожилого возраста и у мужчин, что определяется, по-видимому, условиями заражения. Антитела к вирусу выявлены у $11,8 \pm 0,7\%$ обследованных.

Заключение. В Республике Карелия выявлено устойчивое снижение регистрируемой заболеваемости КЭ, связанное в основном с действием биологических и природных факторов. Оценка серопревалентности позволила выявить скрытую часть эпидемического процесса.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, заболеваемость, вирусофорность, обращаемость, антитела

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом при Министерстве здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 48 от 10.03.2023).

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: Рубис Л.В., Чевская В.Е., Екимова О.В., Сафонова О.С. Оценка регистрируемого и скрытого эпидемического процесса клещевого энцефалита в Республике Карелия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):472–484.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-401>

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

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-401>

Assessment of registered and hidden epidemic process of tick-borne encephalitis in the Republic of Karelia

Lyudmila V. Rubis¹, Victoriya E. Chevskaya², Olga V. Ekimova², Olga S. Safonova²

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

²Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Karelia, Petrozavodsk, Russia

Abstract

Introduction. The incidence of tick-borne encephalitis in the Russia remains relevant. The assessment of the epidemic process in the Republic of Karelia is important not only in terms of understanding its general patterns, but in connection with the growth of tourist attendance in the region.

Aims: To assess the current epidemic situation of tick-borne encephalitis in the Republic of Karelia, and to compare the characteristics of registered and hidden epidemic processes.

Materials and methods. The risk of infection and incidence were estimated based on the analysis of the registered cases of seeking medical help in connection with tick bites, the results of a study of tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection rate in ticks, and the epidemiological investigation of cases of tick-borne encephalitis in 1992–2022. Clinical, gender and age structure, territorial distribution of patients and victims of the tick bites were compared with the results of serological studies of 2379 blood samples of the adult population, conducted in 2011–2022.

Results. Infection rates of ticks removed from humans ranged from 23.6–27.0% in 2002–2005 to 1.0% in 2022. In 2004, the TBEV antigen was detected in mosquitoes. The territory of risk is the southern part of Republic. However, the increase in number of cases of seeking medical help was observed in the northern part of Republic. The incidence rates exceeded the national average, especially in 2003–2004 (15.3–11.6 per 100 thousand). In 2021–2022, it decreased to 1.8–1.5 per 100,000. The dynamics of incidence had a high-degree correlation with the dynamics of seeking medical help and infection rates in ticks ($R = 0.92$ and 0.73). The reported incidence was lower than the estimated risk of infection. The meningeal forms of infection were most often diagnosed. The risk of the disease was higher in the elderly and in men, which was determined by the conditions of infection. Antibodies to TBEV were detected in $11.8 \pm 0.7\%$ of the examined persons.

Conclusion. A steady decrease in rates of registered tick-borne encephalitis incidence has been revealed in the Republic of Karelia, mainly due to the action of biological and natural factors. The assessment of seroprevalence made it possible to reveal the hidden part of the epidemic process.

Keywords: tick-borne encephalitis, morbidity, virus infection, seeking medical help, antibodies

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee under the Ministry of Health of the Republic of Karelia and Petrozavodsk State University (protocol No. 48, March 10, 2023).

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: Rubis L.V., Chevskaya V.E., Ekimova O.V., Safonova O.S. Assessment of registered and hidden epidemic process of tick-borne encephalitis in the Republic of Karelia. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):472–484. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-401>. EDN: <https://www.elibrary.ru/wjaimw>

Введение

Вирусный клещевой энцефалит (КЭ) в России, несмотря на снижающуюся на протяжении двух десятилетий заболеваемость, остаётся серьёзной проблемой для здравоохранения в силу тяжести болезни и её последствий, широкого ареала и среднего эпидемического потенциала возбудителя [1–3]. Снижение заболеваемости КЭ обусловлено комплексом биологических, природных и социальных факторов, одним из которых является наблюдаемое по крайней мере с 2015 г. сокращение доли инфицированных особей среди удалённых с людей клещей [1, 4, 5]. В то же время обращаемость за медицинской помощью по поводу присасывания клещей в 2014–2022 гг. не имела тенденции к снижению и в среднем составила 343,1 на 100 тыс. населения [6, 7]; как и в странах Европы, выявлено расширение ареала переносчиков вируса в северном и западном направлениях [8–12]. Рост заболеваемости в 2022 г. рассматривается как возможное начало очередного макроцикла [2]. Вместе с тем регистрируемая заболеваемость КЭ не от-

ражает в полной мере широту и интенсивность распространения возбудителя в связи со значительной частотой бессимптомных или остающихся недиагностированными лёгких форм инфекции [13, 14], формирующих «скрытую» часть эпидемического процесса, оценить которую позволяют сероэпидемиологические исследования [14, 15].

Одним из 48 эндемичных по КЭ субъектов страны является Республика Карелия (РК), по уровню заболеваемости отнесённая к территориям среднего эпидемиологического риска [11]. РК находится на северо-западе России между 60° и 66° с.ш., граничит с Мурманской, Архангельской, Вологодской и Ленинградской областями, на западе на всем протяжении — с Финляндией. Из 18 административных образований эндемичными по КЭ являются 13, находящихся южнее $64,5^\circ$ с.ш.¹ Более двух третей

¹ Письмо Федеральной службы по надзору от 01.02.2023 № 02/1545-2023-32 «О перечне эндемичных территорий по клещевому вирусному энцефалиту в 2022 г.».

территории РК является местом обитания *Ixodes persulcatus* P. Sch., для которого установлено расширение границ в пределах эндемичных районов. В юго-западной части РК обитает *I. ricinus* L., ареал которого несколько сузился, а северная граница распространения не изменилась [16, 17].

Среди *I. persulcatus* в РК выявлена циркуляция вируса КЭ, принадлежащего к Балтийской группе Сибирского субтипа [18]. Вирусофорность клещей в 2000–2021 гг. варьировала от 23,6 до 1,3% [19], в *I. persulcatus* РНК вируса обнаруживали чаще, чем в *I. ricinus* [18]. Установлена сильная корреляция динамики заболеваемости КЭ в 2000–2021 гг. с обращаемостью по поводу присасывания клещей и их заражённостью [19, 20]. Антитела класса IgG к вирусу КЭ в разные годы были выявлены у 11,9–13,0% жителей РК [19, 21, 22]. Несмотря на то что вопросы КЭ и биологии его переносчиков в РК рассматриваются в ряде публикаций, представленные в них сведения позволяют лишь в общих чертах оценить эпидемическую ситуацию в РК, туристическая посещаемость которой в последние годы резко выросла. Более глубокий анализ данных, характеризующих предполагаемый и реальный риск заболевания КЭ в РК, важен не только для оценки локальной ситуации, но и для понимания общих для страны закономерностей эпидемического процесса и его прогнозирования.

Цель исследования — оценить современную эпидемическую ситуацию по КЭ в РК, сопоставить характеристики регистрируемого и скрытого эпидемического процесса.

Материалы и методы

Эпидемиологическое исследование

Исследование проведено с использованием описательного метода эпидемиологического анализа (ретроспективный анализ, корреляционный анализ). Многолетняя динамика обращаемости за медицинской помощью в связи с присасыванием клещей изучена по данным, представленным в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РК» (ранее — Республиканский центр госсанэпиднадзора) медицинскими организациями г. Петрозаводска с 1992 по 2022 г. и медицинскими организациями всех административных образований РК с 2002 по 2022 г. По данным журналов учёта оказания помощи ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» г. Петрозаводска проанализированы возрастная и гендерная структура взрослых лиц, обратившихся в учреждение в связи с присасыванием клещей. В анализ возрастной структуры включены данные о 8166 случаях обращений лиц в возрасте 20 лет и старше в 2001–2003, 2009–2010 и 2017–2019 гг., что составило 77,4% от 10 554 случаев обращений взрослого населения, зарегистрированных в городе

в эти годы. Гендерная структура проанализирована по данным о 1037 случаях обращений в 2017–2019 гг. (42,0% из 2471 случаев).

Многолетняя динамика заболеваемости КЭ в РК проанализирована за период с 1992 по 2022 г. Анализ заболеваемости по административным районам проведён по данным официальной статистики (1997–2022 гг.) и данным эпидемиологического расследования случаев заболеваний (2002–2017 гг.). По данным карт эпидемиологического расследования изучены клинические формы КЭ (1998–2022 гг.), возрастные (2001–2022 гг.) и гендерные (1992–2022 гг.) особенности заболеваемости у взрослых, условия заражения (2010–2022 гг.).

Лабораторные исследования

Вирусофорность клещей проанализирована по данным вирусологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РК» за 1992–2022 гг. Всего в лаборатории за этот период исследовано 77 296 клещей, в том числе 74 088 снятых с людей.

Исследования проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие антигена вируса КЭ, с 2006 г. — ИФА и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В 2006–2010 гг. методом ПЦР исследовали только клещей, собранных в природе. С 2011 г. использовали набор реагентов для выявления РНК/ДНК 4 возбудителей «Ампли-Сенс TBEV, B. burgdorferi sl, A. phagocytophilum, E. chaffeensis/E.muris-FL» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора). Для ИФА использовали набор реагентов «ВектоВКЭ-антиген» («Вектор-Бест»). С 2011 г. исследовано 35 447 клещей, снятых с людей, в том числе 27 563 методом ПЦР и 7884 — методом ИФА, а также 2059 клещей, собранных в природе, методом ПЦР. В 2004 г. проведено исследование 13 пулов (по 10 штук) комаров, доставленных из 2 районов (8 пулов комаров рода *Aedes* и 5 пулов комаров рода *Anopheles*), с целью выявления антигена к вирусу КЭ.

С 2011 по 2022 г. ежегодно проводились исследования проб крови здоровых взрослых лиц на наличие антител к вирусу КЭ (от 93–95 проб в 2011 и 2018 гг. до 306–316 проб в 2012–2013 гг.). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом при Министерстве здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 48 от 10.03.2023).

Отбор и доставка проб осуществлялись медицинскими организациями на основании плана Управления Роспотребнадзора по РК. В каждом административном образовании пробы отбирали в течение 2–6 лет, у жителей Петрозаводска — ежегодно (за исключением 2016 г.). Общее число проб

у жителей Петрозаводска — 807, в остальных 17 административных образованиях — 40–172.

Исследования методом твердофазного ИФА проводили в лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РК» с использованием наборов реагентов «ВектоВКЭ-IgG» («Вектор-Бест»), предназначенных для выявления и количественного определения иммуноглобулинов класса G (IgG) к вирусу КЭ. В данном исследовании иммуноглобулины только выявляли, без количественного определения их содержания в пробах (в 2012 г. у 53 человек указаны количественные показатели).

Ретроспективно проанализированы результаты исследований 2379 проб сывороток крови. С целью снижения влияния на результат случайных факторов (заражение за пределами места проживания) административные образования были объединены в 2 группы: группа эндемичных районов (11 районов и Петрозаводск — 2056 проб) и группа неэндемичных районов (4 района и Костомукша — 323 пробы).

Статистическая обработка

Статистическая обработка полученных результатов проведена с применением пакета программ «Microsoft Office Excel 2010». Показатели обращаемости и заболеваемости рассчитывали на основании данных государственной статистики по РК о численности населения². Число лиц, подвергшихся риску инфицирования в результате присасывания клещей (X), определяли по формуле:

$$X = \text{сумма } (A \times B) / 100,$$

где A — число лиц, обратившихся за помощью в связи с присасыванием клещей; B — показатель заражённости клещей, удалённых с людей (%).

С целью подтверждения статистической достоверности показателей применяли метод расчёта стандартной ошибки (m) с уровнем доверительной вероятности 95% и выше ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Заражённость клещей вирусом КЭ

В 1992–2001 гг. ежегодно исследовали около 1 тыс. клещей, в 2002–2022 гг. — от 2 до 5 тыс. (в 2003 г. — 50 071 экземпляр). Всего за последние 20 лет исследовано 73,3% клещей, удалённых с людей, обратившихся в медицинские учреждения, в том числе в 2017–2022 гг. — 91,3%. Заражённость клещей, удалённых с людей, вирусом КЭ в 1992–2001 гг. варьировала от 2,2% (1998 г.) до 14,3% (2001 г.). В 2002–2005 гг. показатели вирусифорности выросли до 23,6–32,0%, после чего

постоянно снижались: с 9,9% в 2006 г. до 1,0% в 2022 гг. (рис. 1). Снижение показателей частично можно объяснить внедрением метода ПЦР, обладающего более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с ИФА [23, 24]. Однако то, что снижение началось в 2006–2010 гг., когда ИФА оставался основным методом исследования, и продолжилось в годы, когда подавляющее большинство исследований проводилось с использованием одного и того же набора реагентов для ПЦР, свидетельствует об объективном характере этого явления. Частота обнаружения РНК вируса в клещах, собранных в природе ($2,2 \pm 0,3\%$), и клещах, удалённых с людей ($2,0 \pm 0,1\%$), в отдельные годы различалась, но в среднем за 2011–2022 гг. различие оказалось недостоверным.

В 2004 г. на фоне пика вирусифорности клещей антиген вируса КЭ был выявлен в 3 из 8 пулов комаров *Aedes* и во всех 5 пулах *Anopheles*, доставленных из эндемичного и наиболее южного из неэндемичных районов. Несмотря на то что производитель тест-систем указывает их 100% специфичность, установлено, что ИФА клещей с использованием набора «ВектоВКЭ-антиген» может давать перекрёстные реакции с вирусами серокомплекса КЭ и другими микроорганизмами, обитающими в иксодовых клещах. Более того, ложноположительные реакции с вирусами комплекса КЭ может давать и ПЦР [23, 24]. Это ставит под сомнение достоверность полученных результатов. Вместе с тем сообщение о неоднократном выделении штаммов вируса КЭ от комаров *Aedes vexans* в Хабаровском крае, у которых установлено сходство структур геномов с вирусами КЭ, выделенными из клещей *I. persulcatus* и из мозга погибших людей, проявляющих патогенность при пассировании на лабораторных мышах и цитопатическое действие *in vitro* [25], даёт основание задуматься о возможности участия комаров в циркуляции вируса. Других исследований, подтверждающих или опровергающих возможность сохранения и репродукции вируса КЭ в комарах, подобных тем, которые проводились в отношении разных видов клещей [26], найти не удалось. Отсутствие эпидемиологических наблюдений о заражении КЭ при укусах комаров не исключает такую возможность, т.к., во-первых, люди могут одновременно подвергаться нападению инфицированных клещей и комаров, во-вторых, количество вируса в комарах может быть недостаточно для развития клинически выраженного заболевания. В то же время для возбудителей природно-очаговых заболеваний поливекторность эволюционно оправдана и на сегодня доказано участие различных видов членистоногих в переносе возбудителей ряда болезней на разных территориях.

² Карелиястат. Численность и состав населения.
URL: <https://krl.gks.ru/Nas>



Рис. 1. Число обращений за медицинской помощью в связи с присасыванием иксодовых клещей в Петрозаводске и РК, зараженность клещей, удалённых с людей, вирусом КЭ и расчётное число лиц, к которым произошло присасывание инфицированных клещей, в 1992–2022 гг.

Fig. 1. Number of cases seeking medical help in connection with the bites of ixodid ticks in Petrozavodsk and the Republic of Karelia, the number of ticks infected with tick-borne encephalitis virus removed from people, and the estimated number of people who were bitten by infected ticks in 1992–2022.

Обращаемость по поводу присасывания клещей

Число обращений населения за медицинской помощью в связи с присасыванием клещей в г. Петрозаводске в период с 1992 по 2001 г. колебалось от 500 до 2005 человек. В медицинские организации РК с 2002 по 2022 г. обратились 81 809 человек. Резкий рост числа обращений зафиксирован в 2003–2004 гг. (6618 и 5707 случаев). В эти же годы наблюдался и рост численности клещей при стационарных наблюдениях [20]. В дальнейшем обращаемость имела тенденцию к снижению и в 2022 г. достигла минимального уровня — 2781 человек (рис. 1). В период с 2002 по 2022 г. на Петрозаводск пришлось 40,2% (от 33,6 до 52,5% в разные годы) от числа всех обращений в медицинские организации РК. Коэффициент линейной корреляции (R) динамики обращаемости в Петрозаводске и РК составил 0,91. Используя его, мы рассчитали число обратившихся в целом по РК с 1992 по 2001 г. (на рис. 1 показано пунктиром).

Установлено, что некоторая часть обращений регистрировалась дважды: при обращении для удаления клеща и для введения иммуноглобулина по результатам его исследования. В то же время часть пострадавших, особенно проживающих в сельской местности, могла не обращаться за медицинской помощью. Установить реальное число лиц, подвергшихся нападению клещей, за все годы наблюдения не представляется возможным, но можно предполагать, что оно близко к регистрируемым показателям. Число лиц, подвергшихся риску инфицирования в результате присасывания заражённых клещей в РК в 1992–2022 гг., рассчитанное по формуле, указанной в разделе «Материалы и методы», составило 10 490 человек (в том числе в 1992–2001 гг. — 2780 человек, в 2002–2022 гг. — 7710 человек) — 1,7% от численности населения РК в 2022 г.

Около 90% обращений регистрировались в районах, расположенных в южной части РК, где были наиболее высокие показатели обращаемости

на 100 тыс. населения. Во всех 5 неэндемичных северных районах с 1990-х гг. начали регистрироваться отдельные случаи обращений, а в последние два десятилетия их количество значительно выросло. В 2004–2022 гг. суммарно в них зарегистрировано 615 обращений (0,9% от всех обращений по РК). Отсутствие информации о территориях, на которых происходило присасывание клещей, не позволяет проанализировать вовлечённость неэндемичных районов, однако столь значительное число обращений даёт основание предполагать, что на территориях, считавшихся свободными от клещей, в настоящее время случаи присасывания происходят нередко. Это ставит под сомнение ранее сделанный вывод о том, что находки клещей севернее границы его распространения в РК относятся к категории случайных заносов [17].

Из общего числа обратившихся в медицинские организации с 2002 по 2022 г. взрослые составили в РК 68,2%, в Петрозаводске — 80,0%. Анализ возрастной структуры взрослых, обратившихся в 2001–2003, 2009–2010 и 2017–2019 гг. в медицинские организации города, показал, что наиболее высокой (в среднем 52,8%) во все 3 периода была доля лиц в возрасте 50 лет и старше, а наиболее низкой — в группе 20–29 лет (13,4%). При пересчёте на численность населения каждой возрастной группы это соотношение сохранилось, кроме группы 20–29 лет в 2009–2010 гг., что может объясняться недостаточным числом наблюдений (табл. 1). Гендерная структура обращающихся взрослых в 2017–2019 гг. в Петрозаводске была практически постоянна и в среднем составила: мужчины — $55,6 \pm 1,5\%$, женщины — $44,36 \pm 1,5\%$, что согласуется с результатами эпидемиологического расследования, свидетельствующими о том, что наиболее частым местом заражения КЭ являются дачи, где его риск одинаков для мужчин и женщин. С про-

фессиональной деятельностью в природных очагах инфекции с 2010 г. связано лишь $3,8 \pm 1,1\%$.

Сокращение частоты обращений населения за медицинской помощью по поводу присасывания клещей может быть следствием снижения численности популяций последних на территориях, где наиболее часто реализуется их контакт с людьми, снижения настороженности населения или доступности медицинской помощи. Последний фактор мог играть определённую роль в период пандемии COVID-19, а в остальные годы в сельской местности, но не в районных центрах и Петрозаводске. Вряд ли можно говорить и о серьёзном снижении настороженности населения, т.к. высокая (около 30%) заражённость клещей возбудителем болезни Лайма требует обращения за медицинской помощью для организации её антибиотикопрофилактики, в связи с чем в РК проводится активная информационная работа. Более вероятно предполагать, что стабильное снижение обращаемости отражает процесс снижения численности клещей.

Заболееваемость КЭ

Всего в 1992–2022 гг. в РК зарегистрировано 1248 случаев КЭ. Многолетняя динамика заболеваемости за 31-летний период наблюдения, несмотря на циклические колебания показателей, характеризовалась их ростом с конца прошлого века, особенно выраженным в 2003 г. (15,3 на 100 тыс.), с 2004 г. сменившимся снижением, а с 2011 г. до настоящего времени — некоторой стабилизацией на уровне 3,8–5,6 на 100 тыс. (в 2012, 2021 и 2022 гг. — 1,5–2,7 на 100 тыс.). Уровень заболеваемости в ХХ в. был близок к среднефедеральному, но с начала ХХI в. ситуация в РК оказалась более неблагоприятной, и лишь в последние годы показатели вновь стали приближаться к средним по стране (рис. 2). Пик заболеваемости в 2003–2004 гг. (15,3–11,6 на

Таблица 1. Возрастная структура обращающихся за медицинской помощью в связи с присасыванием иксодовых клещей в Петрозаводске в 2001–2003, 2009–2010 и 2017–2019 гг.

Table 1. Age structure of those who seek medical help in connection with the bite of ixodid ticks in Petrozavodsk in 2001–2003, 2009–2010 and 2017–2019

Период Period	Показатель Indicator	Возраст, лет Age, years				Всего Total
		20–29	30–39	40–49	> 50	
2001–2003	абс. abs.	608	686	861	1925	4080
	%	14,9	16,8	21,1	47,2	100,0
	$\%_{0000}$	$1259,8 \pm 50,8$	$1594,7 \pm 60,4$	$1827,6 \pm 61,7$	$2530,5 \pm 56,9$	$1902,5 \pm 29,4$
2009–2010	абс. abs.	253	251	245	899	1648
	%	15,4	15,2	14,9	54,6	100,0
	$\%_{0000}$	$539,0 \pm 33,8$	$571,8 \pm 36,0$	$576,2 \pm 36,7$	$1018,1 \pm 33,8$	$743,5 \pm 18,2$
2017–2019	абс. abs.	234	379	336	1489	2438
	%	9,6	15,6	13,8	61,1	100,0
	$\%_{0000}$	$592,0 \pm 38,6$	$760,7 \pm 38,9$	$909,4 \pm 49,4$	$1632,0 \pm 41,9$	$1120,7 \pm 22,6$

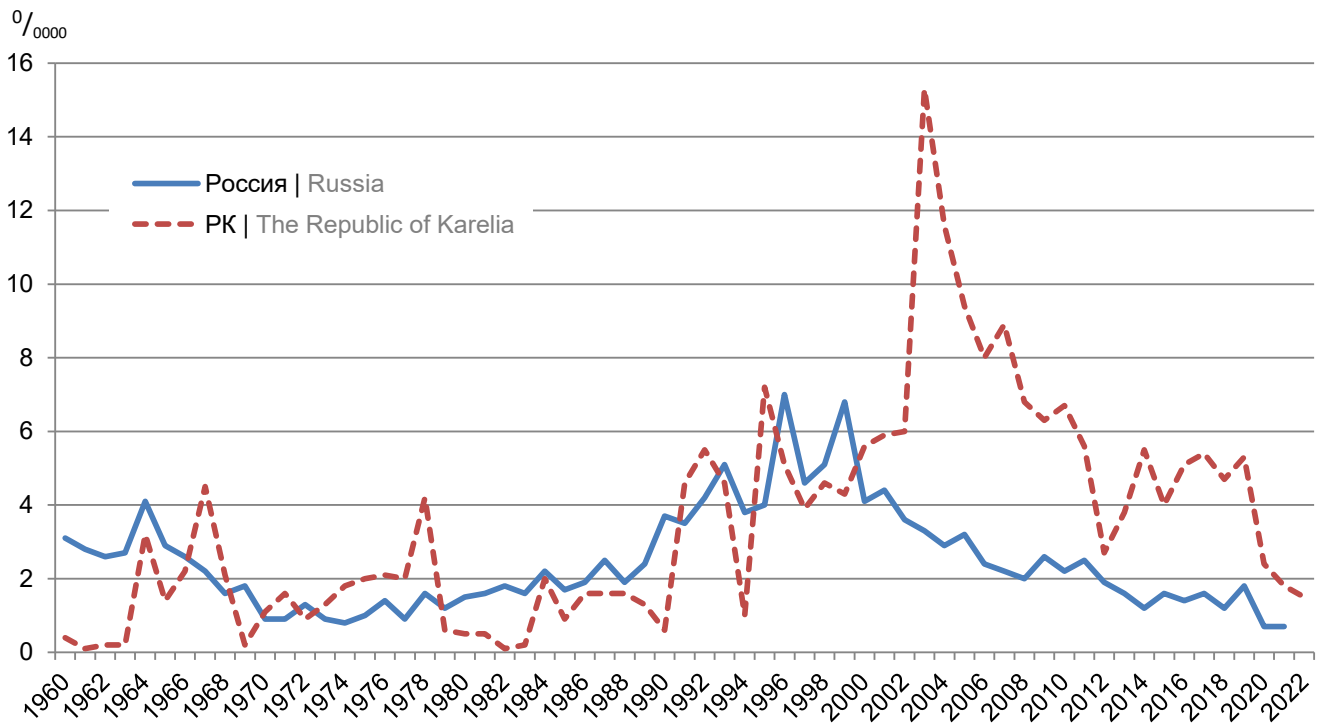


Рис. 2. Заболеваемость КЭ населения России и РК в 1960–2022 гг. (на 100 тыс. населения).

Fig. 2. The incidence of tick-borne encephalitis in the population of the Russian Federation and the Republic of Karelia in 1960–2022 (per 100 thousand population).

100 тыс.) соответствовал максимальным уровням обращаемости и вирусофорности клещей. В 2002–2022 гг. динамика заболеваемости КЭ имела корреляцию высокой степени с динамикой обращаемости населения, пострадавшего от клещей ($R = 0,92$), и с их заражённостью вирусом КЭ ($R = 0,79$). Устойчивая тенденция снижения заболеваемости, вирусофорности клещей и обращаемости населения по поводу присасывания клещей дают основание говорить о снижении интенсивности эпизоотического и, как следствие, эпидемического процесса КЭ в РК. До какого уровня и как долго может продолжаться снижение, сказать трудно, поскольку причины его, как и резко подъёма ранее, до конца не ясны.

Среднегодовые показатели заболеваемости в эндемичных районах в 1997–2021 гг. колебались от 0,4 до 13,2 на 100 тыс. Наиболее высокие показатели были в районах центральной и восточной части юга РК, где единственным или доминирующим видом иксодовых клещей является *I. persulcatus*. В то же время на юго-западе — зоне преобладания *I. ricinus* или симпатрии обоих видов — заболеваемость была значительно ниже, а в одном из районов, где находили только *I. ricinus*, случаи заболевания вообще не регистрировались. В 2003 г. в неэндемичном Кемском районе был выявлен случай заражения (зарегистрирован в другом районе), в двух других неэндемичных районах в 2009 и 2014 гг. регистрировались слу-

чай КЭ, однако, по данным эпидемиологического расследования, заражение происходило вне места проживания.

Число зарегистрированных случаев КЭ в РК в 1992–2022 гг. оказалось в 8,4 раза ниже расчётного числа лиц, подвергавшихся риску заражения в эти годы. Причин такого расхождения может быть несколько: ложноположительные результаты при выявлении антигена вируса в клещах [23, 24], содержание у части присосавшихся клещей вируса в количестве, недостаточном для того, чтобы вызвать клинически выраженную форму заболевания [14, 27], гиподиагностика заболевания, высокий уровень коллективного иммунитета и эффективность экстренной профилактики.

Наиболее частой формой КЭ в РК была менингеальная, доля которой варьировала от 21,5% в 2005 г. до 61,1–66,7% в 1998 и 2022 гг., в среднем составив 43,7% от всех случаев заболевания (рис. 3). Частота лихорадочных и стёртых форм варьировала в пределах 25,0–24,0% (1998, 2015 гг.) — 54,9% (2004 г.) — 90,9% (2021 г.), в среднем — 37,0%, а очаговых — 9,7% (от 3,0–4,4% в 2001 и 2019 гг. до 23,5% в 2012 г.). Необычными оказались 2021 г. (диагностированы только 10 лихорадочных и 1 очаговая форма) и 2022 г. (всего 9 случаев и ни одной очаговой формы), что, скорее всего, объясняется гиподиагностикой на фоне пандемии COVID-19. Клиническая структура КЭ несколько отличалась

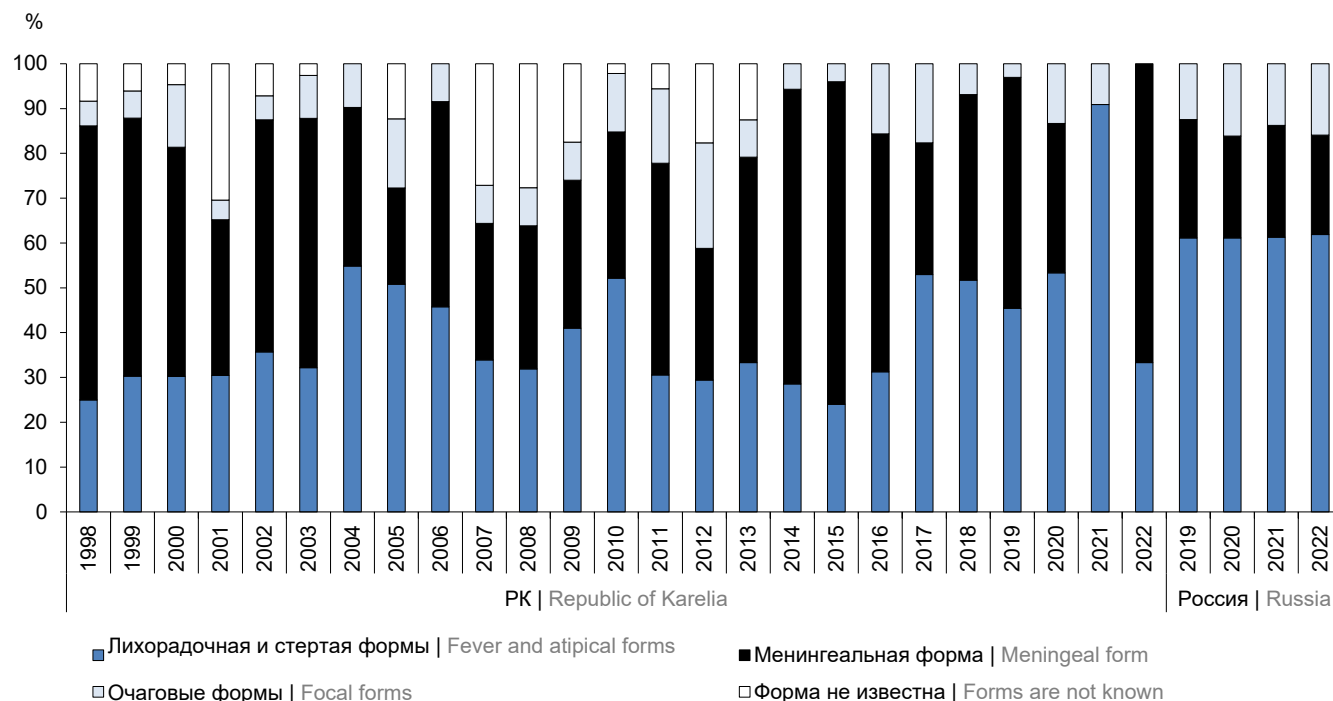


Рис. 3. Структура клинических форм КЭ в РК в 1998–2022 гг. и в России в 2019–2022 гг. (%).

Fig. 3. Structure of clinical forms of tick-borne encephalitis in the Republic of Karelia in 1998–2022 and in Russia in 2019–2022 (%).

от средних показателей по стране, где в 2019–2022 гг. преобладали лихорадочные формы [2, 11, 12, 28] (рис. 3), что вызывает вопросы, учитывая циркуляцию в РК наиболее распространённого в стране сибирского варианта вируса. Более низкая частота лихорадочных форм в РК частично объясняется их неполным выявлением в районах. Так, в 2014–2017 гг. доля лихорадочных и стёртых форм в Петрозавод-

ске составила 45,2%, а в остальных административных образованиях — 25,0%. В то же время нельзя полностью исключить и гипердиагностику лихорадочных форм как в РК, где в 2010–2022 гг. у 21,7% больных диагноз был поставлен только на основании клиники и факта присасывания клеща, так и на других территориях при не 100% верификации диагноза обнаружением антител класса IgM, т.к. по-

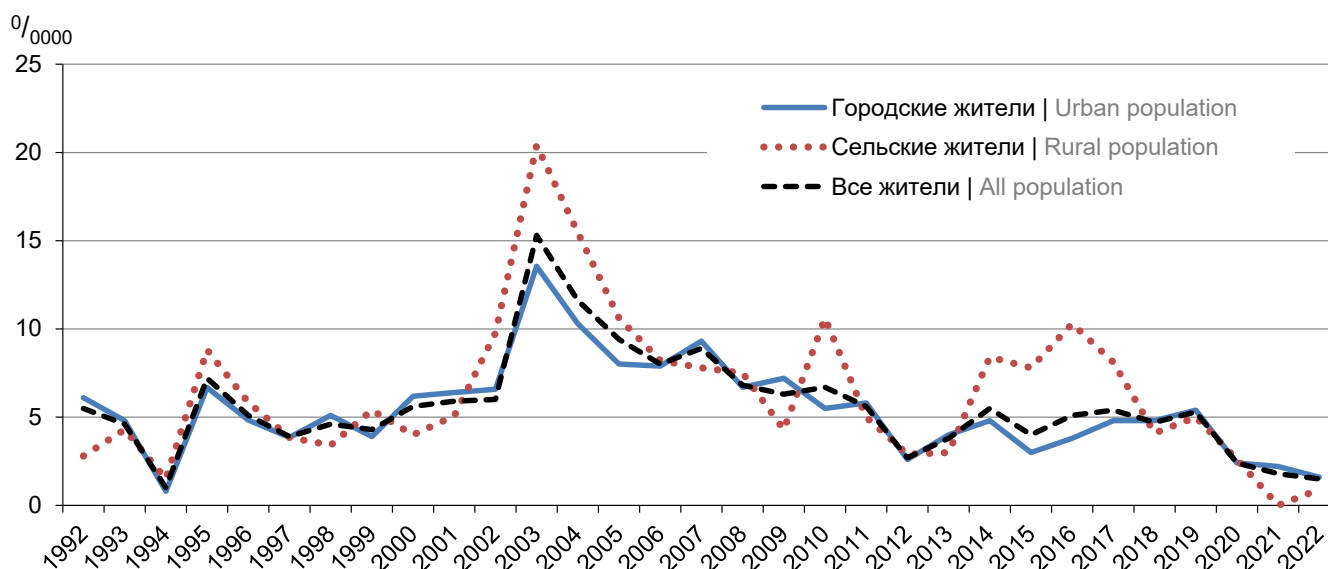


Рис. 4. Заболеваемость КЭ городского и сельского населения РК в 1992–2022 гг. (на 100 тыс.).

Fig. 4. The incidence of tick-borne encephalitis in the urban and rural population of the Republic of Karelia in 1992–2022 (per 100 thousand).

добную клинику могут давать и другие возбудители, передаваемые иксодовыми клещами.

Структуру клинических форм КЭ, как и другие характеристики заболеваемости, в РК определяли преобладавшие среди больных горожане, что характерно и для других регионов России [12]. Прямой зависимости между увеличением доли сельского населения среди заболевших (до 31,4–40,6% в 2003, 2010, 2014–2017 гг.) и сокращением частоты лихорадочных форм, которую можно было бы предполагать, не выявлено. Объяснением этому может быть то, что у части сельских жителей КЭ диагностировался в Петрозаводске. В то же время показатели заболеваемости сельских жителей в отдельные годы были выше, чем горожан (рис. 4), причём в современный период различие более выражено, чем в 1990-е гг., что говорит о сохранении для них высокого риска заражения. Низкая заболеваемость сельских жителей в 2021–2022 гг. может быть обусловлена снижением доступности медицинской помощи из-за пандемии.

Наибольшую долю среди заболевших, как и среди пострадавших от нападения клещей, составили лица старше 50 лет, что характерно и для России в целом [1]. В этой группе были и самые высокие показатели заболеваемости на 100 тыс., хотя они достоверно не отличались от минимальных показателей у лиц 20–29 лет (табл. 2). Как и в целом по стране [1], среди больных преобладали мужчины, но их доля снизилась с 86,4–87,5% в 1992–1994 гг. до 40,0–69,0% в 2018–2022 гг., хотя и оставалась более высокой, чем среди обратившихся за медицинской помощью по поводу присасывания клещей (в 2017–2019 г. в РК среди больных — 69,8%, в Петрозаводске среди обратившихся — 55,6%). При пересчёте на численность мужчин и женщин это оказалось результатом не только снижения заболеваемости первых, но и роста заболеваемости вторых (рис. 5). В качестве причин этих изменений можно рассматривать следующие: увеличение охвата вакцинацией групп профессионального риска, повышение значимости такого фактора риска зара-

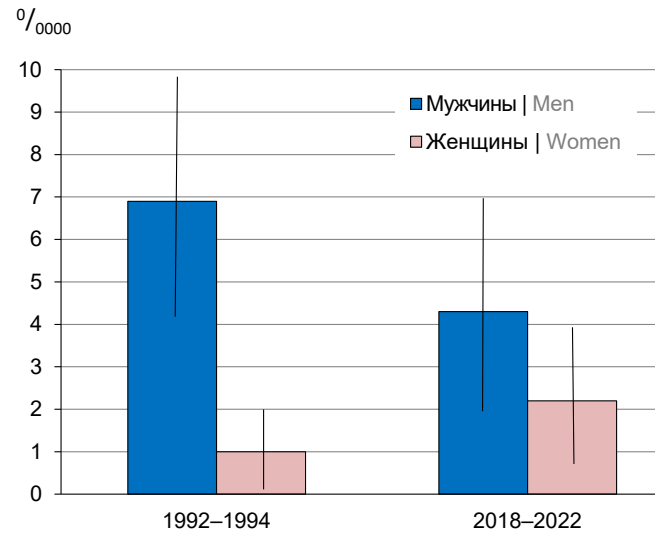


Рис. 5. Заболеваемость КЭ мужчин и женщин в РК в 1992–1994 и 2018–2022 гг.

Fig. 5. The incidence of tick-borne encephalitis in men and women in the Republic of Karelia in 1992–1994 and in 2018–2022.

жения, как отдых горожан на даче, и улучшение диагностики заболевания.

Специфический иммуноглобулин в РК более 20 лет ежегодно получали 12,4–44,8% от числа всех обратившихся за медицинской помощью по поводу присасывания клеща, в основном при положительном результате исследования клеща или при невозможности проведения исследования. Ежегодно в этот период вакцинировалось 3–7 тыс. человек (около 0,5–1,0% населения), ревакцинировалось 4–9 тыс. Среди обратившихся по поводу присасывания клещей в последнее десятилетие привиты были лишь около 4–5% детей и 6% взрослых, причём не всегда они имели своевременно выполненные ревакцинации. Таким образом, если проведение постконтактной профилактики могло оказать положительное влияние на уровень заболеваемости, то низкая прослойка людей, имеющих поствакцинальный иммунитет, существенно на него не влияла.

Таблица 2. Возрастная характеристика заболеваемости КЭ взрослого населения РК в 2001–2006 и 2017–2022 гг.

Table 2. Age characteristics of the incidence of tick-borne encephalitis in the adult population of the Republic of Karelia in 2001–2006 and 2017–2022

Период Period	Показатель Indicator	Возраст, лет Age, years				Всего Total
		20–29	30–39	40–49	> 50	
2001–2006	абс. abs.	48	56	68	155	327
	%	14,7	17,1	20,8	47,4	100,0
	‰ ₀₀₀₀	16,0 ± 5,7	21,8 ± 7,2	23,8 ± 7,1	32,7 ± 6,4	24,9 ± 3,4
2017–2022	абс. abs.	7	27	21	58	113
	%	6,2	23,9	18,6	51,3	100,0
	‰ ₀₀₀₀	1,8 ± 1,7	4,6 ± 2,2	3,9 ± 2,1	4,2 ± 1,3	3,9 ± 0,9

В связи с этим важное значение приобретает оценка естественного «проэпидемичивания» населения.

Оценка серопревалентности населения

При серологическом исследовании 2379 проб крови антитела класса IgG к вирусу КЭ выявлены в 281 (11,8 ± 0,7%) случае. Количественный анализ IgG у 53 человек в 2012 г. показал, что у 25 (47,2%) человек их титр составил 1 : 800–1 : 1600, у 12 (22,6%) — 1 : 400 и 16 (30,2%) — 1 : 100–1 : 200. Недостаточное количество исследований не позволяет сделать убедительных умозаключений, однако обнаружение у 69,8% обследованных антител на уровне выше порога защитного действия (1 : 800 согласно СанПиН 3.3.686-21) или обеспечивающего быструю элиминацию вируса 1 : 400 [27], даёт основание для гипотезы о том, что несоответствие регистрируемой заболеваемости расчётному показателю риска заражения в значительной степени обусловлено наличием коллективного иммунитета. Обязательным условием при сборе проб было отсутствие заболевания КЭ в анамнезе или вакцинации против него. При анализе результатов выяснилось, что в отдельных случаях это условие не соблюдалось, но в целом полученные данные характеризуют результат естественного «проэпидемичивания» населения.

Наши результаты практически совпали с данными других авторов, выявивших IgG к вирусу КЭ в 11,9% при исследовании в 1982–1984 гг. проб крови 3042 непривитых жителей 13 районов РК методом реакции непрямой гемагглютинации [21], 13% при исследовании в 2018–2019 гг. 292 проб методом ИФА в другой лаборатории [22]. При этом показатели регистрируемой заболеваемости в 2011–2022 гг. были существенно выше, чем в 1980–1984 гг., — 4,0 и 0,7 на 100 тыс. соответственно. По данным лите-

ратуры, IgG к вирусу КЭ в концентрации 1 : 100 не всегда удаётся обнаружить методом ИФА [29], следовательно, доля инфицированных могла быть даже несколько выше выявленной. Несмотря на вероятные различия информативности методов реакции непрямой гемагглютинации и ИФА, в целом можно сделать вывод о том, что число лиц, подвергавшихся риску заражения, значительно выше числа выявленных случаев заболевания.

Наиболее низкий показатель серопревалентности выявлен среди лиц 30–39 лет — 8,5 ± 1,1%. В остальных возрастных группах показатели не имели достоверных различий: 50 лет и старше — 13,8 ± 1,2%, 40–49 лет — 11,9 ± 1,2%. Самый высокий показатель оказался в группе 20–29 лет — 16,9 ± 9,5% (за счёт жителей Петрозаводска), но из-за малого числа исследованных проб результат в этой группе нельзя считать достоверным. Продолжительность сохранения гуморального постинфекционного иммунитета неизвестна, но можно предполагать, что без стимулирования бустерными дозами он, как и поствакцинальный, постепенно угасает, следовательно, выявленные различия подтвердили достоверно более высокую вероятность контакта с возбудителем у пожилых людей. Частота выявления антител у мужчин была несколько выше, чем у женщин: 14,3 ± 1,3 и 10,6 ± 0,8%, но различие показателей не было достоверным, что также согласуется с данными заболеваемости и обращаемости. Антитела к вирусу КЭ выявлялись как у жителей эндемичных территорий, так и территорий, не относимых к таковым (табл. 3), однако у последних они встречались в 5,3 раза реже: 13,3 ± 0,7 и 2,5 ± 0,9 соответственно. В первой группе частота обнаружения IgG в Петрозаводске составила 13,3 ± 1,2%, в остальных районах — от 6,2 ± 1,9 до 28,5%, в среднем 13,3 ± 1,0%. Более высокие показатели

Таблица 3. Результаты исследования проб крови населения РК на антитела к вирусу клещевого энцефалита в 2011–2022 гг.

Table 3. The results of the serosurvey assessing the prevalence of antibodies to the tick-borne encephalitis virus in the Republic of Karelia in 2011–2022

Группа Group	Эндемичные территории Endemic areas			Неэндемичные территории Non-endemic areas		
	исследовано проб number of tested samples	из них выявлены антитела к вирусу КЭ of which are positive for antibodies to TBEV		исследовано проб number of tested samples	из них выявлены антитела к вирусу КЭ of which are positive for antibodies to TBEV	
		абс. abs.	абс. abs. %		абс. abs.	абс. abs. %
Все Total	2056	273	13,3 ± 0,7	323	8	2,5 ± 0,9
Мужчины Men	672	107	15,9 ± 1,4	99	3	3,0 ± 1,7
Женщины Women	1384	166	12,0 ± 0,9	224	5	2,2 ± 1,0
20–29 лет years	148	25	16,89 ± 9,5	0	0	0
30–39 лет years	542	51	9,4 ± 1,3	140	5	3,6 ± 1,6
40–49 лет years	580	82	14,1 ± 1,4	112	2	1,8 ± 1,3
> 50 лет years	786	117	14,9 ± 1,3	71	1	2,8 ± 1,9

выявлены в районах, где преимущественно обследовались лица пожилого возраста. Среди населения 5 неэндемичных территорий антитела не выявлены у жителей 2 районов (43 и 62 проб), ещё в 2 районах выявлено по одному серопозитивному из 90 и 46 обследованных лиц, среди жителей г. Костомукша антитела обнаружены у 6 из 80 обследованных. В 1980-гг., отмеченные довольно активной миграцией на север РК населения других регионов страны, частота обнаружения антител у населения неэндемичных районов составляла 8,1–17,1% [21]. Нельзя исключить возможность заражения за пределами места проживания и в нашем исследовании, но в сопоставлении с данными о числе обращений по поводу присасывания клещей можно предполагать и возможность заражения в неэндемичных районах. Возрастные и гендерные различия были характерны для обеих групп территорий, но в группе неэндемичных районов из-за недостаточного числа наблюдений достоверность показателей была низкой (табл. 3).

Результаты серологических исследований выявили более активный эпидемический процесс КЭ, чем можно было бы предполагать на основании только регистрируемой заболеваемости. Более того, доля серопозитивных среди обследованных оказалась в 6,9 раза выше, чем доля лиц, с которых были удалены инфицированные клещи, в 1992–2022 гг. Можно предполагать, что в ряде случаев встреча с клещом, особенно на стадии нимфы, осталась незамеченной его жертвой. Факт присасывания клеща не всегда устанавливался у заболевших, в Санкт-Петербурге доля таких случаев в 2006–2017 гг. составила 20,0–37,1% [30]. В отдельных случаях заражение могло происходить при употреблении сырого коровьего молока: в середине XX в. выявлена высокая (до 100%) заклещевлённость коров в южных районах РК [31]. Но к началу XXI в. животноводство в РК, в том числе в частных хозяйствах, было почти ликвидировано, поэтому алиментарный путь заражения КЭ можно рассматривать как уникальное явление. Результаты изучения эпидемического процесса КЭ, в том числе его скрытой от рутинного надзора части, ставят вопрос: а все ли мы знаем о циркуляции вируса КЭ в природе. И этот вопрос требует дальнейшего серьёзного изучения.

Выводы

В РК выявлено устойчивое снижение регистрируемой заболеваемости КЭ после бурного подъёма в начале века, связанное более с действием биологических и природных, нежели социальных факторов. Характеристики эпидемического процесса в целом соответствуют наблюдаемым в других регионах страны, а его современные особенности должны быть учтены при организации диагностики и профилактики заболевания. Оценка серопре-

валентности, выявившая более широкий контакт населения с вирусом, чем можно было ожидать по данным регистрируемой заболеваемости, позволила более полно изучить эпидемический процесс.


СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Колясникова Н.М., Ишмухаметов А.А., Акимкин В.Г. Современное состояние проблемы клещевого энцефалита в России и мире. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2023;22(1):104–23. Kolyasnikova N.M., Ishmukhametov A.A., Akimkin V.G. The current state of the problem of tick-borne encephalitis in Russia and the world. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2023;22(1):104–23. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-1-104-123> EDN: <https://elibrary.ru/yeynhd>
2. Андаев Е.И., Никитин А.Я., Толмачёва М.И. и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(1):6–16. Andaev E.I., Nikitin A.Ya., Tolmacheva M.I., et al. Epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2022 and forecast of its development for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(1):6–16. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-6-16> EDN: <https://elibrary.ru/giaacs>
3. Сафонова М.В., Симонова Е.Г., Лопатин А.А. и др. Разработка критериев количественной оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(4):745–54. Safonova M.V., Simonova E.G., Lopatin A.A., et al. Development of quantitative criteria for assessing epidemic potential of the natural-focal viral infections. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(4):745–54. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-DOQ-192>
4. Никитин А.Я., Андаев Е.И., Толмачёва М.И. и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации за 2011–2021 гг. и краткосрочный прогноз ее развития. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(1):15–23. Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Tolmacheva M.I., et al. Epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2011–2021 and short-term forecast of its development. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(1):15–23. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-15-23> EDN: <https://elibrary.ru/arpdz>
5. Андаев Е.И., Никитин А.Я., Яцменко Е.В. и др. Тенденции развития эпидемического процесса клещевого вирусного энцефалита в Российской Федерации, лабораторная диагностика, профилактика и прогноз за 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(1):6–16. Andaev E.I., Nikitin A.Ya., Yatsmenko E.V., et al. Trends in epidemic process development of tick-borne encephalitis in the Russian Federation, laboratory diagnosis, prophylaxis and forecast for 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(1):6–16. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-6-16> EDN: <https://elibrary.ru/jewjur>
6. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации в 2021 г.». М.; 2022. State report «About the sanitary and epidemiological situation in the Russian Federation in 2021». Moscow; 2022.
7. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации в 2022 г.». М.; 2023. State report «About the sanitary and epidemiological situation in the Russian Federation in 2021». Moscow; 2022.

8. Токаревич Н.К., Тронин А.А., Бузинов Р.В. и др. Анализ риска заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в районах с разными климатогеографическими условиями. *Анализ риска здоровью*. 2021;(4):127–35. Tokarevich N.K., Tronin A.A., Buzinov R.V., et al. Analyzing risks of incidence of tick-borne encephalitis in areas with different climatic and geographical conditions. *Health Risk Analysis*. 2021;(4):127–35. DOI: <https://doi.org/10.21668/health.risk/2021.4.14.eng> EDN: <https://elibrary.ru/ctemoe>
9. Гнатив Б.Р., Токаревич Н.К. Результаты многолетнего мониторинга клещевого вирусного энцефалита и клещевого боррелиоза в Республике Коми. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(4):707–22. Gnativ B.R., Tokarevich N.K. Long-term monitoring of tick-borne viral encephalitis and tick-borne borreliosis in the Komi Republic. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(4):707–22. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ROL-1299> EDN: <https://elibrary.ru/nxhtts>
10. Коренберг Э.И., Сироткин М.Б., Ковалевский Ю.В. Адаптивные черты биологии близких видов иксодовых клещей, определяющие их распространение (на примере таежного *Ixodes persulcatus* Sch. 1930 и европейского лесного *Ixodes ricinus* L. 1758). *Успехи современной биологии*. 2021;141(3):271–86. Korenberg E.I., Sirotkin M.B., Kovalevskiy Yu.V. Adaptive features of the biology of similar species of ixodes ticks that determine their distribution (on the example of the Taiga – *Ixodes persulcatus* Sch. 1930 and European forest — *Ixodes ricinus* L. 1758). *Advances of Modern Biology*. 2021;141(3):271–86. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0042132421030078> EDN: <https://elibrary.ru/zgvvvv>
11. Uusitalo R., Siljander M., Lindén A., et al. Predicting habitat suitability for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks in Finland. *Parasit. Vectors*. 2022;15(1):310. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05410-8>
12. Van Heuverswyn J., Hallmaier-Wacker L.K., Beauté J., et al. Spatiotemporal spread of tick-borne encephalitis in the EU/EEA, 2012 to 2020. *Euro. Surveill.* 2023;28(11):2200543. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.11.2200543>
13. Bogovic P., Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases*. 2015;3(5):430–41. DOI: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430>
14. Нафеев А.А., Киселева Л.М., Мерцалова С.Л. Эпидемические признаки клещевых инфекций в Ульяновской области. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2011;(3):81–5. Nafeev A.A., Kiseleva L.M., Mertsalova S.L. Epidemic signs of tick-borne infections in the Ulyanovsk region. *Ulyanovsk Biomedical Journal*. 2011;(3):81–5. EDN: <https://elibrary.ru/oxefzd>
15. Нафеев А.А., Савельева Н.В., Сибяева Э.И. Иммунологический (серологический) мониторинг в системе эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016;21(5):286–9. Nafeev A.A., Savel'eva N.V., Sibaeva E.I. Immunological (serological) monitoring in the epidemiological surveillance system of natural focal infections. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2016;21(5):286–9. DOI: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2016-21-5-286-289> EDN: <https://elibrary.ru/xbhqzq>
16. Беспятова Л.А., Бугмырин С.В., Кутенков С.А. и др. Численность иксодовых клещей (*Acari Ixodidae*) на мелких млекопитающих в лесных биотопах среднетаежной подзоны Карелии. *Паразитология*. 2019;53(6):463–73. Bespyatova L.A., Bugmyrin S.V., Kutenkov S.A., et al. Number of ixodid ticks (*Acari Ixodidae*) on small mammals in forest biotopes of the middle taiga subzone of Karelia. *Parasitology*. 2019;53(6):463–73. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0031184719060036> EDN: <https://elibrary.ru/hyjjyz>
17. Беспятова Л.А., Бугмырин С.В. О распространении европейского лесного клеща *Ixodes ricinus* (*Acarina, Ixodidae*) в Республике Карелия. *Зоологический журнал*. 2021;100(7):745–55. Bespyatova L.A., Bugmyrin S.V. On the distribution of the European forest tick *Ixodes ricinus* (*Acarina, Ixodidae*) in the Republic of Karelia. *Zoological Journal*. 2021;100(7):745–55. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0044513421070035> EDN: <https://elibrary.ru/rljctp>
18. Bugmyrin S.V., Romanova L.Y., Belova O.A., et al. Pathogens in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus* ticks (*Acari, Ixodidae*) in Karelia (Russia). *Ticks Tick Borne Dis.* 2022;13(6):102045. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102045>
19. Рубис Л.В., Екимова О.В., Сафонова О.С. и др. Сходство и различия характеристик эпидемического процесса клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза. *Журнал инфектологии*. 2023;15(2):139–47. Rubis L.V., Ekimova O.V., Safonova O.S., et al. Similarities and differences in the characteristics of the epidemical process tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis. *Journal Infectiology*. 2023;15(2):139–47. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2023-15-2-139-147> EDN: <https://elibrary.ru/tlsudf>
20. Беспятова Л.А., Бугмырин С.В. Видовой состав, распространение основных переносчиков и эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту в Республике Карелия. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2017;(1):13–20. Bespyatova L.A., Bugmyrin S.V. Species composition, distribution of the disease vectors and epidemiology of tick-borne encephalitis in the Republic of Karelia. *Actual Questions of Veterinary Biology*. 2017;(1):13–20. EDN: <https://elibrary.ru/ygrorv>
21. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А. и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации, М.; 2001. Lvov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., et al. *Atlas of Distribution of Natural Foci Virus Infections on the Territory of Russian Federation*. Moscow; 2001. EDN: <https://elibrary.ru/tzngoh>
22. Токаревич Н.К., Блинова О.В., Стоянова Н.А. и др. Серопревалентность клещевых заболеваний в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(5):891–901. Tokarevich N.K., Blinova O.V., Stoyanova N.A., et al. Seroprevalence of tick-borne diseases in the Northwest Federal District of the Russian Federation. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(5):891–901. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SOT-1953> EDN: <https://elibrary.ru/qvyuuq>
23. Белова О.А., Буренкова Л.А., Карань Л.С. и др. Эффективность детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах (*Acari: Ixodidae*) с помощью ИФА и ПЦР в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2014;59(5):38–43. Belova O.A., Burenkova L.A., Karan' L.S., et al. Tickborne encephalitis virus detection efficiency in ixodid ticks (*Acari: Ixodidae*) with ELISA and real-time PCR. *Problems of Virology*. 2014;59(5):38–43. EDN: <https://elibrary.ru/snvrvn>
24. Холодилов И.С., Белова О.А., Мотузов О.В. и др. Оценка зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита с использованием различных методов исследования. Неоднозначность трактовки результатов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(3):29–36. Kholodilov I.S., Belova O.A., Motuzov O.V., et al. Ambiguous interpretation of the results of TBEV prevalence in ticks evaluation using different methods. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(3):29–36. EDN: <https://elibrary.ru/sghrht>

25. Пуховская Н.М., Морозова О.В., Белозерова Н.Б. и др. Сравнительный анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от комаров и клещей. *Вопросы вирусологии*. 2017;62(1):30–5. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Belozerova N.B. et al. Comparative analysis of genomes of tick-borne encephalitis virus strains isolated from mosquitoes and ticks. *Problems of Virology*. 2017;62(1):30–5. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-30-35> EDN: <https://elibrary.ru/mctxpd>
26. Белова О.А., Холодильов И.С., Литов А.Г. и др. Способность иксодовых клещей (*Acari: Ixodidae*) разных видов поддерживать репродукцию вируса клещевого энцефалита. *Паразитология*. 2018;52(4):268–379. Belova O.A., Kholodilov I.S., Litov A.G., et al. Ability of ixodid ticks (*Acari: Ixodidae*) to support reproduction of the tick-borne encephalitis virus. *Parazitologia*. 2018;52(4):268–379. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0031184718040029> EDN: <https://elibrary.ru/yymbmhj>
27. Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Лубова В.А. и др. Комплексная оценка влияния специфических антител на инфекционную активность вируса клещевого энцефалита. *Инфекция и иммунитет*. 2019;9(3-4):559–67. Leonova G.N., Maistrovskaya O.S., Lubova V.A., et al. Comprehensive assessment of specific antibodies on infectious activity of tick-borne encephalitis virus. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2019;9(3-4):559–67. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-559-567> EDN: <https://elibrary.ru/tswwwzj>
28. Никитин А.Я., Андаев Е.И., Яценко Е.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(1):33–42. Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Yatsmenko E.V., et al. Epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2019 and forecast for 2020. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(1):33–42. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-33-42> EDN: <https://elibrary.ru/vlsxpxq>
29. Чернохаева Л.Л., Майкова Г.Б., Рогова Ю.В. и др. Сопоставление результатов иммуноферментного анализа и реакции нейтрализации при оценке защищённости населения от клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2018;63(1):36–40. Chernokhaeva L.L., Maykova G.B., Rogova Yu.V., et al. Comparison of results obtained by ELISA and neutralization test in assessing the protection of population from tick-borne encephalitis. *Problems of Virology*. 2018;63(1):36–40. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-36-40> EDN: <https://elibrary.ru/yoombm>
30. Нечаев В.В., Яковлев А.А., Усков А.Н. и др. Актуальные природно-очаговые инфекции, передаваемые клещами в Санкт-Петербурге. *Журнал инфектологии*. 2018;10(4):104–115. Nechaev V.V., Yakovlev A.A., Uskov A.N., et al. Urgent natural foci infections transmitted by ticks in Saint-Petersburg. *Journal of Infectology*. 2018;10(4):104–115. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-104-115> EDN: <https://elibrary.ru/yynxzb>
31. Лутта А.С., Хейсин Е.М., Шульман Р.Е. К распространению иксодовых клещей в Карелии. В кн.: *Труды Карельского филиала академии наук СССР. Выпуск XIV. Вопросы паразитологии Карелии*. Петрозаводск; 1959:72–83. Lutta A.S., Kheysin E.M., Shul'man R.E. To the distribution of ixodid ticks in Karelia. In: *Proceedings of the Karelian Branch of the Academy of Sciences of the USSR. Issue XIV. Questions of parasitology of Karelia*. Petrozavodsk; 1959:72–83.

Информация об авторах

Рубис Людмила Викторовна  — к.м.н., доцент, доцент каф. факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии Петрозаводского государственного университета, Петрозаводск, Россия, rublusja@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6602-9621>

Чевская Виктория Евгеньевна — зав. вирусологической лаб. Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия, Петрозаводск, Россия, <https://orcid.org/0009-0007-0924-3526>


Екимова Ольга Викторовна — зоолог Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия, Петрозаводск, Россия, <https://orcid.org/0009-0006-0442-8436>

Сафонова Ольга Сергеевна — энтомолог Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия, Петрозаводск, Россия, <https://orcid.org/0009-0004-3617-4616>

Вклад авторов: Чевская В.Е., Екимова О.В., Сафонова О.В. — сбор и обработка материала, проведение лабораторных исследований; Рубис Л.В. — концепция и дизайн исследования, организация сбора и обработки материала, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, редактирование. 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 01.09.2023;
принята к публикации 15.11.2023;
опубликована 28.12.2023

Information about the authors

Lyudmila V. Rubis  — Cand. Sci. (Med.), associate professor, associate professor, Department of faculty therapy, phthisiology, infectious diseases and epidemiology, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia, rublusja@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6602-9621>

Victoriya E. Chevskaya — Head, Virology laboratory, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Karelia, Petrozavodsk, Russia, <https://orcid.org/0009-0007-0924-3526>

Olga V. Ekimova — zoologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Karelia, Petrozavodsk, Russia, <https://orcid.org/0009-0006-0442-8436>

Olga S. Safonova — entomologist, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Karelia, Petrozavodsk, Russia, <https://orcid.org/0009-0004-3617-4616>

Author contribution: Chevskaya V.E., Ekimova O. V., Safonova O.S. — collection and processing of material, laboratory researches; Rubis L.V. — concept and design of the study, organization of the collection and processing of material, collection and processing of material, statistical processing, writing the text, editing. 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 01.09.2023;
accepted for publication 15.11.2023;
published 28.12.2023



Bacteria of genus *Filifactor* in patients with periodontitis and type 2 diabetes in accordance with metagenomic analysis of the periodontal microbiome

Tatyana V. Tsareva, Oleg O. Yanushevich, Viktor N. Tsarev[✉], Irina P. Balmasova

Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Periodontal diseases are a common pathology with chronic periodontitis (CP) being the most severe form. This polymicrobial disease has become a problem of great importance in recent years due to the possibility of development of systemic effects associated with this condition. CP is often combined with type 2 diabetes (T2D). The main cause of the occurrence and development of periodontal pathology is played by the bacteria *Filifactor alocis*, the least studied and most recently discovered periodontal pathogen.

The objective of this study was to identify bacteria of genus *Filifactor* as part of the periodontal microbiome associated with CP and T2D and to clarify the mechanisms of their possible influence on associated metabolic processes according to comparative metagenomic analysis.

Materials and methods. A metagenomic study of the microbiome of periodontal pocket samples from 28 patients with CP associated with T2D and 22 patients with CP, as well as the microbiome of dental gingival sulcus samples from 19 clinically healthy individuals was performed. 16S-sequencing of the ribosomal RNA gene was used to determine the taxonomic composition of the microbiome. Prediction of metabolic pathways involving the microbiome was performed with the help of the shotgun method.

Results. *Filifactor* bacteria were the one of the most frequent microorganisms only in patients with CP associated with T2D. The rate of identification of these bacteria was correlated with low predicted metagenomic levels of fatty acid biosynthesis and pyrimidine metabolism in the affected area.

Conclusion. The detection frequency of *Filifactor* bacteria in patients associated with CP and T2D is negatively correlated with the selected features of putative metabolic pathways of the microbiome, which include fatty acid biosynthesis and pyrimidine metabolism.

Keywords: *Filifactor* bacteria, subgingival microbiome, metabolism, chronic periodontitis, type 2 diabetes

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Interuniversity Ethics Committee of Moscow (protocol No. 06-22, June 6, 2022).

Acknowledgement. The study was carried out using the unique scientific facility Transgenobank (Institute of Gens Biology of the Russian Academy of Sciences).

Funding source. The manuscript was prepared with funding from the authors' place of work (State assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 056-00035-21-00, December 17, 2020).

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

For citation: Tsareva T.V., Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Balmasova I.P. Bacteria of genus *Filifactor* in patients with periodontitis and type 2 diabetes in accordance with metagenomic analysis of the periodontal microbiome. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):485–494.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-428>

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

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-428>

Бактерии рода *Filifactor* у больных пародонтитом и сахарным диабетом по данным метагеномного анализа микробиома пародонта

Царева Т.В., Янушевич О.О., Царев В.Н.[✉], Балмасова И.П.

Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Заболевания пародонта — распространённая патология, наиболее тяжёлой формой которой является хронический пародонтит. Проблема этого полимикробного заболевания в последние годы приобрела особое значение в связи с возможностью развития ассоциированных с ним системных эффектов. Довольно часто хронический пародонтит сочетается с сахарным диабетом 2-го типа (СД2). Основную роль в возникновении и развитии патологии пародонта играют бактерии, наименее изученным среди которых является относительно недавно открытый пародонтопатоген — *Filifactor alocis*.

Целью исследования являлось выявление бактерий рода *Filifactor* в составе микробиома пародонта при ассоциации хронического пародонтита и СД2 и уточнение механизмов их возможного влияния на ассоциированные метаболические процессы на основании сравнительного метагеномного анализа.

Материалы и методы. Проведено метагеномное исследование образцов микробиома пародонтальных карманов 28 пациентов с ассоциацией хронического пародонтита и СД2 и 22 пациентов с хроническим пародонтитом, а также микробиома зубодесневой борозды у 19 клинически здоровых людей. Для определения таксономического состава микробиома использовалось 16S-секвенирование гена рибосомальной РНК, проводилось прогнозирование метаболических путей с участием микробиома методом дробовика.

Результаты. Полученные результаты позволили установить, что только при ассоциации хронического пародонтита и СД2 одними из наиболее часто встречающихся микроорганизмов были бактерии рода *Filifactor*, процент регистрации которых коррелировал с низкими показателями метагеномного прогнозирования биосинтеза жирных кислот и метаболизма пиримидина в очагах поражения.

Вывод. Частота встречаемости бактерий рода *Filifactor* у пациентов с ассоциацией хронического пародонтита и СД2 отрицательно коррелирует с отдельными особенностями предполагаемых метаболических путей микробиома, в число которых входят биосинтез жирных кислот и метаболизм пиримидина.

Ключевые слова: бактерии рода *Filifactor*, субгингивальный микробиом, метаболизм, хронический пародонтит, сахарный диабет типа 2

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Межвузовским комитетом по этике г. Москвы (протокол № 06-22 от 16.06.2022).

Благодарность. В работе была использована инфраструктура Уникальной научной установки «Трансгенбанк» (НИИ биологии гена РАН).

Источник финансирования. Рукопись подготовлена за счёт финансирования по месту работы авторов (Государственное задание Минздрава России № 056-00035-21-00 от 17.12.2020).

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

Для цитирования: Царева Т.В., Янушевич О.О., Царев В.Н., Балмасова И.П. Бактерии рода *Filifactor* у больных пародонтитом и сахарным диабетом по данным метагеномного анализа микробиома пародонта. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):485–494.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-428>

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

Introduction

Periodontal diseases are widespread among the adult population of our planet. Thus, about 740 million people in the world suffer from severe periodontitis [1]. The relevance of this problem is even greater due to the fact that in recent years both pathogenetic and causal relationship has been established between oral diseases and somatic diseases [2]. The relationship between periodontitis and such systemic pathologic conditions as type 2 diabetes (T2D), rheumatoid arthritis, atherosclerosis, adverse pregnancy outcomes, etc. is widely discussed in other studies [3–5]. The persistent association of T2D and chronic periodontitis (CP) as the two diseases with the highest prevalence worldwide is of particular importance [6, 7].

The International Diabetes Federation predicts that the incidence of diabetes will steadily increase over a long period of time and the number of patients will exceed 500 million people by 2030 [8, 9]. Among patients with diabetes, about 90% are patients with T2D, a non-insulin-dependent diabetes caused by a combination of decreased insulin secretion by pancreatic β -cells and increased cellular resistance to insulin [10]. Many researchers show that metabolic changes associated with diabetes are manifested at the systemic level and contribute to the damage of many organs and tissues, including the development of CP [11, 12], although the mutual influence of these pathological processes is not excluded either [3, 5].

CP has a polymicrobial nature. It is caused by a number of microorganisms with properties of periodontal pathogens and characterized by irreversible course, accompanied by chronic inflammation of periodontal tissues and its destruction along with damage to the bone structure and tooth supporting apparatus, which eventually leads to tooth loss. All the main causative agents of this disease (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, etc.), the so-called periodontal pathogens of the I and II order or bacteria of the "red" and "orange" complexes, as they were originally called in international literature, are in complex interactions with each other and with the immune system of the host organism, which provokes both the development of local changes in periodontal tissues and the following consequences of these inflammatory and degenerative changes on the systemic level [3, 13, 14].

Thanks to the development of biotechnology, there is enough evidence that the oral microbiome in CP is the main factor in the development of diabetes [15], although there are still uncertainties in the study of the role of individual periodontal pathogens in this problem.

Most studies on the relationship between periodontal and systemic diseases have focused primarily on the role of *Porphyromonas gingivalis*, which is con-

sidered a key periodontal pathogen [3, 14]. In recent years, emphasis has been placed on the study of other red complex periodontal pathogens. In addition to the red complex bacteria, attention has been called upon the importance of other culturable bacteria (*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eykinella corrodens*, *Eubacterium nodatum*, *Wolinella recta*) associated with periodontitis, as well as non-culturable (under the conditions of a conventional clinical laboratory) bacteria — *Selenomonas*, *Sinergistes*, *Desulfobulbus*, *TM7*, *Filifactor alocis*, identified as new potential pathogens or orange complex periodontal pathogens [3, 13, 16, 17].

One of the representatives of these species, *Filifactor alocis* (*F. alocis*), is a Gram-positive spore-forming bacillus with obligatory anaerobic respiration, forming filamentous clusters in the gingival biofilm, which grows extremely slowly on nutrient media and has low biochemical activity, which makes its identification difficult [18, 19]. *F. alocis* is an asaccharolytic bacterium that utilizes certain amino acids, especially arginine, for its growth [20].

The main habitat of *F. alocis* in the human body is the gingival sulcus and possibly the intestine, while a healthy person does not usually contain these bacteria in the microbiome of their oral cavity (except for smokers), unlike people suffering from periodontal disease [20]. *F. alocis* bacteria have unique properties such as resistance to oxidative stress, the ability to induce systemic bone mass loss, the presence of genes encoding a well-developed amino acid metabolism pathway, which allows them to colonize periodontal tissues, to cause periodontitis phenomena in the stressful environment of the forming periodontal pocket like other traditional periodontal pathogens [21–23]. These features of *F. alocis*, in addition to its ability to interact with other microbial species to form polymicrobial synergistic relationships, may enhance the invasive properties of these bacteria [24] and cause chronic inflammation [25]. *F. alocis* can penetrate gingival epithelial cells and induce their secretion of pro-inflammatory cytokines, which contributes to the manifestations of pathogenicity of this microbe [26].

Taken together, all these observations point to a specific role of *F. alocis* in the oral cavity, which may be important in the pathologic process [27, 28]. Due to the lack of genetic tools to study this microorganism, for a long time little was known about its ability to influence microbial metabolism in biofilm, its mechanisms of virulence and especially, its role in the induction of systemic effects [21].

Accordingly, **the objective** of the present study was to identify *Filifactor* bacteria in the periodontal microbiome with the association of CP and T2D and to clarify the mechanisms of their possible influence on the associated metabolic processes based on metagenomic analysis.

Materials and methods

Sixty-nine people aged 40–65 years were under observation. The main group included 28 patients with the association of CP and T2D; the comparison group consisted of 22 patients with CP without concomitant somatic pathology; the control group included 19 conditionally healthy individuals with intact periodontium, without clinically expressed manifestations of somatic pathology, with normal blood sugar and glycated hemoglobin levels (**Fig. 1**). The number of women and men in the comparison groups was nearly equal: 13 (46.5%) and 15 (53.5%) in the CP + T2D group, 10 (45.4%) and 12 (54.6%) in the CP group, 9 (47.4%) and 10 (2.6%) in the control group.

Due to the necessity of using pooled samples of biological material for metagenomic studies, the maximum homogeneity of the study groups was a requirement; therefore, patients with mild and severe course of pathological processes were excluded from the study, in other words, all patients under study had a moderately severe course of the diseases. Patients did not receive treatment for CP during the last 6 months. Among patients with T2D, 11 patients received insulin therapy, 13 patients — oral sugar-lowering drugs, 4 patients — combined therapy, which was taken into account when distributing the samples for further pooling.

CP was diagnosed based on clinical and radiologic findings according to the 2018 classification of periodontal diseases [29]. Inclusion criteria of these patients in the study were as follows: periodontitis of medium severity with generalized lesions, the value of loss of gingival attachment CAL 3–4 mm, the depth of probing pockets 4–6 mm, bone loss around teeth not more than 1/3 of the root length, absence of tooth loss associated with the disease. To confirm the diagnosis, we analyzed anamnesis data, determined the PHR (Patient Hygiene Performance), OHI-S (Simplified Oral Hygiene Index), CAL (Clinical Attachment Level), MMI (Miller Mobility Index), PBI (Papillary Bleeding Index), TL (tooth loss) and the orthopantomography (OPG) data.

The diagnosis of T2D was established by an endocrinologist in accordance with the diagnostic criteria of the World Health Organization 1999/2006/2011 [30], taking into account the clinical, anamnestic and laboratory data. Inclusion criteria in the study were as follows: disease duration 3–7 years; moderately compensated disease course; remission stage; blood glucose level < 7.8 mmol/l, glycated hemoglobin level < 8%.

Conditionally healthy control subjects were included in the study only after consultation with a dentist and endocrinologist.

The material for the study was the content of periodontal pockets from patients with CP and dental gingival sulcus in healthy subjects. The material was taken from 4 sites in the area of the gingival sulcus using sterile paper endodontic pins (#30), which were placed in a test tube with 0.2 ml of a sterile physiologic solu-

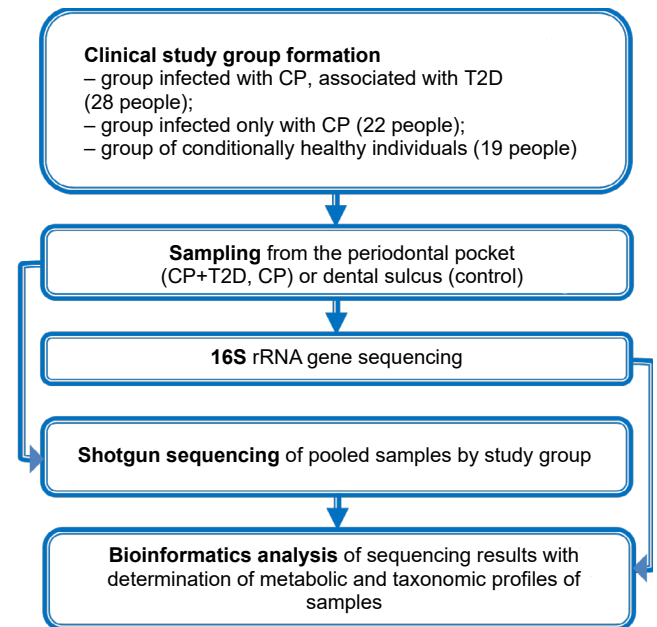


Fig. 1. Study design.

tion and shaken. The samples were stored at -20°C . The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Interuniversity Ethics Committee of Moscow (protocol No. 06-22, June 6, 2022).

Total DNA was extracted from samples using the QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen), the concentration of genomic DNA was determined on a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Enriched microbial DNA (50–100 ng) was fragmented using a Covaris S220 system (Covaris). The final fragment size was determined using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. The purified DNA was amplified using standard primers for the 16S rRNA gene complementary to the V3–V4 region and containing 5'-illumina adaptor sequences.

Sequencing of libraries and analysis of obtained data were performed using MiSeq genetic analyzer (Illumina) and MiSeq Reagent Kit v2 (Pharma).

The microbiome bioinformatics platform QIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology) [31] and the SILVA database [32] were used to perform taxonomic analysis of the results of sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene. Identification of differences at the level of taxonomic compositions was performed by variance analysis of data based on the PERMANOVA test for microbial communities from the QIIME2 functional [33]. The PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) method [34] was used to predict metabolic profile from sequencing and 16S rRNA gene profiling data [34], and STAMP statistical analysis of metabolic profiles was used to detect statistical differences between profiles from groups at the level of

predicted metabolic pathways [35]. Data of metagenomics analysis were visualized using GNU/R software and Vegan package [36].

Results

At the first stage, *16S* gene sequencing of the small subunit of ribosomal RNA was performed, which allowed us to determine the representation of different taxonomic categories of bacteria in the samples from the contents of the patients' dental sulcus.

The bioinformatic analysis revealed quite significant features of the microbial composition of the dental sulcus contents in CP associated with T2D which have never before been noted by other researchers. The features are as follows: significant predominance of 5 taxonomic groups of bacteria — representatives of the *Filifactor* and *Mycoplasma* genera, *Flavobacteriaceae* and *Porphyromonadaceae* families, *Bacillales* order — and lower occurrence of 3 groups: *TM7* as associates of the *actinomycetes*, *Atopobium* and *Fusobacterium* genera (Fig. 2).

The comparative analysis of the taxonomic profile of microbiome of patients with CP, with or without association with T2D, showed more frequent occurrence in the first group of bacteria of the *Filifactor* and *Treponema* genera and lower frequency of occurrence in the microbiome of 5 taxonomic groups: *Bordetella* and *Atopobium* genera, *Fusobacteriaceae* and *Veillonellaceae* families, *TM7*.

In patients with CP without somatic pathology in comparison with healthy people, bacteria of 5 taxonomic groups: *Anaerobaculum* and *Bulleidia* genera, as well as the *Bacillales*, *Bacteroidales*, and *Macellibacteroides* orders were encountered more frequently.

In general, the main peculiarity of the taxonomic profile of the gingival sulcus microbiome with the association of CP+T2D is the predominance of bacteria with periodontal pathogenic properties belonging to the *Filifactor* and *Treponema* genera in the samples. The more frequent occurrence of prokaryotes of the *Mycoplasma* genus, *Flavobacteriaceae* family and *Bacillales* order compared to healthy people is a topic of interest and requires further analysis.

One important fact that should be taken into account is that the most significant feature of the group of patients with CP+T2D is the predominant representation of *Filifactor* genus bacteria in the microbiome. According to this feature, the microbiome of this group differs both from the group of healthy people and from the group of patients with only moderate CP, in which *Filifactor* genus bacteria are found in isolated cases. The question that this brings up is to what extent this feature is associated with the development of diabetes and those metabolic changes observed in T2D and associated mainly with the effect of the microbiome.

At the next stage, sequencing of pooled samples was performed to determine the quantitative preva-

lence of certain taxonomic categories of bacteria in the microbiome by individual pools of biological material with functional traits that allowed to predict the main metabolic pathways of the analyzed pooled microbiome samples belonging to different clinical groups (15 pooled samples in each group).

Differences in the taxonomic diversity of metagenomes were fully reflected in the level of differences in the predicted functional potential of microbial communities by study groups (Fig. 3).

A decrease in relative representation of 8 metabolic pathways was found in the CP+T2D group compared to the controls: fatty acid biosynthesis, pyrimidine metabolism, methane metabolism, glycerolipid metabolism, sphingolipid metabolism, tyrosine metabolism, ascorbate and aldarate metabolism, ubiquinone and other terpenoid-quinones biosynthesis.

When comparing the groups of CP with and without T2D, differences in the representation of 5 metabolic pathways were revealed: in the group of CP+T2D, an increase in cysteine and methionine metabolism and a decrease in pyrimidine metabolism, fatty acid biosynthesis, methane metabolism, and sphingolipid metabolism were observed.

In comparison to the controls, a decrease in the relative representation of 4 metabolic pathways: cysteine and methionine, sulfur, histidine, glycerolipids was found for the CP group.

Ultimately, 4 metabolic pathways can be identified, the low level of which distinguishes the CP+T2D group from controls and the CP group: methane metabolism, sphingolipid metabolism, fatty acid biosynthesis, and pyrimidine metabolism. CP, regardless of association with T2D, was characterized by decreased glycerolipid metabolism.

Functional analysis of pooled samples using the Bray–Curtis criterion confirmed that, in general, the group of CP patients was significantly closer to the control in characterizing metabolic pathways than the CP+T2D group.

Correlation analysis using Spearman correlation coefficient (r) was performed to determine the relationship between the revealed features of metabolic profiles by study groups and the presence of representatives of the genus *Filifactor* in the composition of the periodontal pockets microbiome. The frequency of occurrence of these bacteria in CP+T2D in our study showed a significant level of negative correlation ($r > 0.723$) with the prediction of two metabolic pathways — fatty acid biosynthesis and pyrimidine metabolism, while all these features in patients of this group were registered 3-5 times less frequently than in other cases.

Discussion

The highest occurrence of *Filifactor* bacteria, relatively recently classified to the group of periodontal pathogens of the first order [19], in the association of

CP+T2D has been found by other authors among the predominant representatives of the microbiome of periodontal pockets [37–40], although without a detailed comparison of the occurrence of this microorganism in other groups.

The data obtained by us on the peculiarities of periodontal pockets microbiome metabolism in patients with CP+T2D indicate a rather significant role of disorders of fatty acids, pyrimidine, methane, glycerolipids, and sphingolipids metabolism. Two of these features

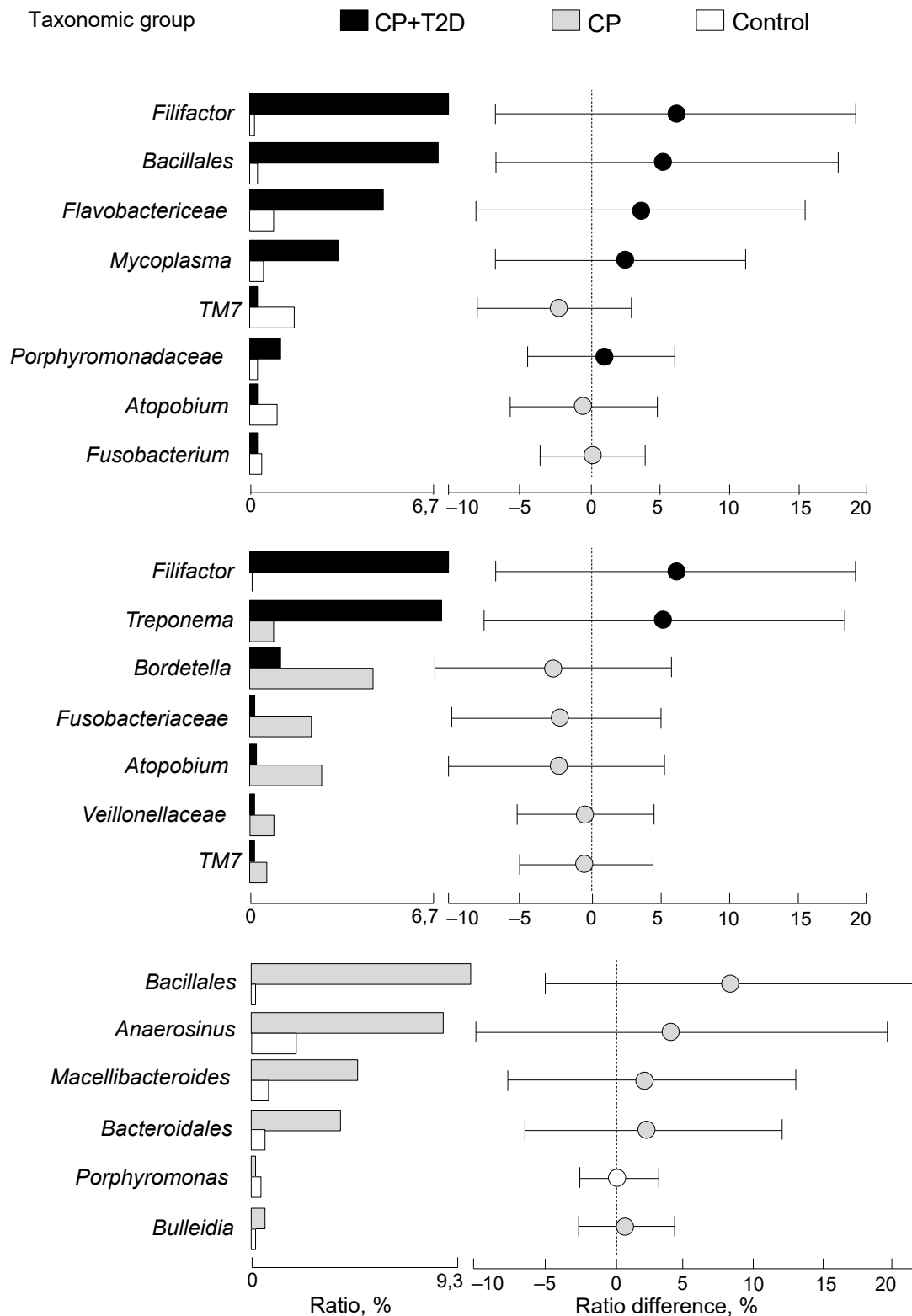


Fig. 2. Taxonomic profile of periodontal pocket microbiome in comparison of study groups.

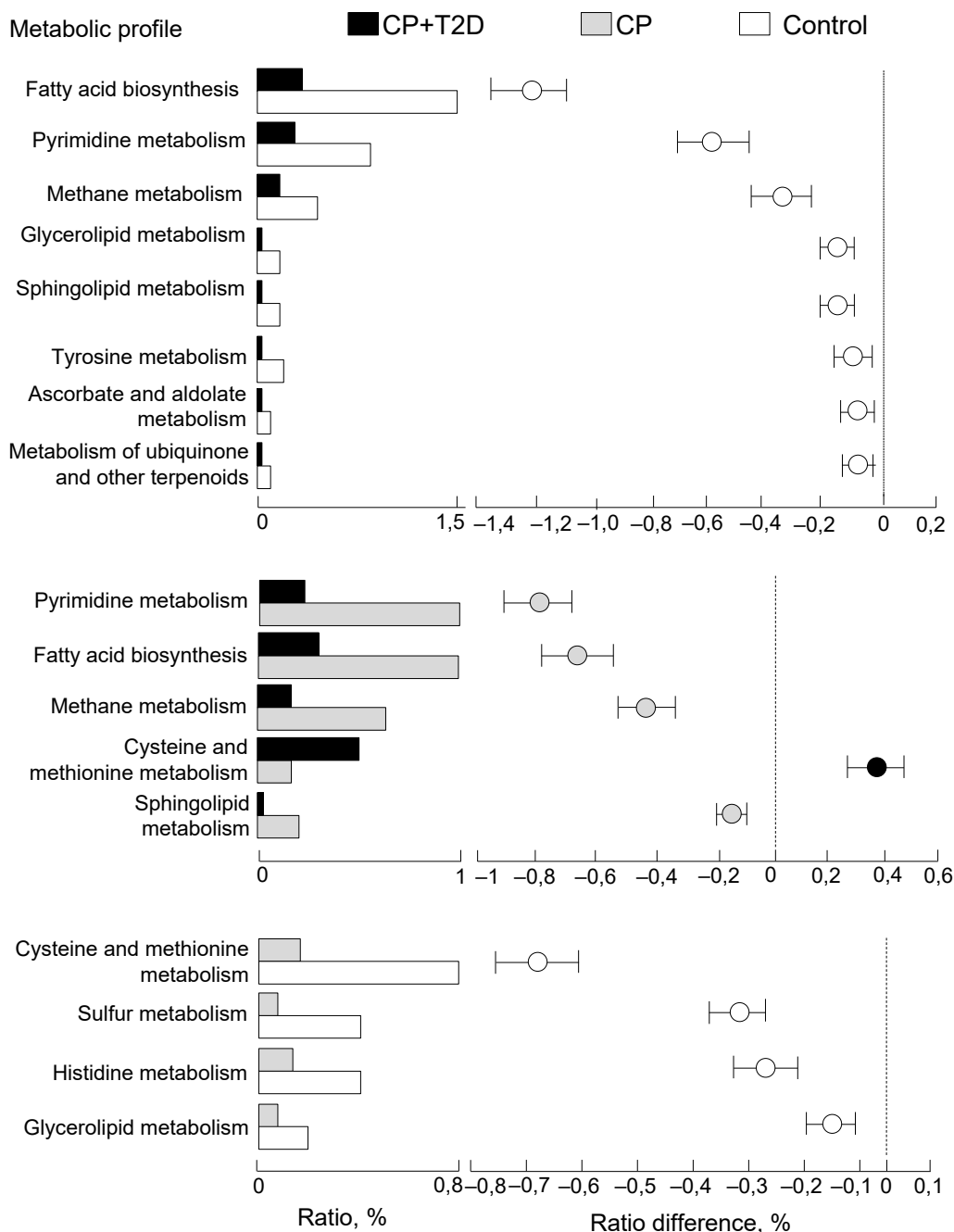


Fig. 3. Predicted profile of periodontal pocket microbiome metabolic pathways in the comparison of the clinical study groups.

(decreased biosynthesis of fatty acids and pyrimidine metabolism) were correlated with the presence of *Filifactor* bacteria in the microbiome. The fact of such correlation was confirmed by us for the first time; at the same time, the importance of these metabolic pathways of the microbiome with the association of CP+T2D is discussed in modern scientific literature.

For example, when evaluating the metabolism of *E. alocis*, there is emphasis on the importance of the biosynthesis of saturated fatty acid, butyric acid, which is involved in the pathogenesis of periodontitis [41]. Moreover, it is even proposed to use microbial butyric

acid as a marker of periodontitis, emphasizing that this compound may affect the body's sensitivity to insulin [42]. There is an opinion that the oral microbiome in CP+T2D may be characterized by a decrease in the number of bacteria producing butyric acid [43]. This somewhat contradicts the data of our study, at least in terms of significant representation of the *Filifactor* genus in the microbiome of the pathology under consideration. At the same time, the deficiency of fatty acids that have been established with the association of CP+T2D may have another explanation. For example, if herpesviruses (especially Epstein-Barr virus) are present in

the microbiome of subgingival biofilm, they have the ability to actively consume the same butyric acid for their reactivation [44]. All of this shows the possibility of ambiguous interpretation of the obtained results and the necessity for further research in this area.

The decrease in pyrimidine metabolism, correlated with the occurrence of *F. alocis*, has also been reported in the scientific literature as a sign of CP. For example, there are reports that genes involved in pyrimidine synthesis had significantly lower relative abundance in patients with periodontitis when compared to healthy controls [45]. Pyrimidine is an agonist of the GR119 receptor associated with hypoglycemic effects and a protective effect against pancreatic β -cells, which even allows us to recommend pyrimidine derivatives as therapeutic agents in T2D [46]. From this point of view, the state of pyrimidine metabolism in the microbiome of periodontal tissues with the participation of *F. alocis* may prove to be a kind of marker of the association of periodontitis with diabetes mellitus, and possibly one of the numerous elements of T2D pathogenesis.

Thus, further study of these phenomena is promising not only from the point of view of deciphering the etiopathogenetic role of bacteria of the genus *Filifactor*, but also from the point of view of improving the methods of diagnostics and treatment of the above mentioned combined pathology.

Conclusion

1. The microbiome of periodontal tissues in patients with CP associated with T2D has a number of peculiarities concerning both its functional features and taxonomic composition. In the latter case, researchers concentrate their focus on recently established and so far poorly studied bacterial representatives of the microbiome that are unculturable and have pronounced periodontal pathogenic properties. Such microorganisms include bacteria of *F. alocis* species in particular.

2. During a metagenomic microbiome analysis of periodontal pockets of patients, *Filifactor* bacteria were found to be significantly more frequent in the microbiome of patients with CP+T2D than in those who only have periodontitis or in healthy individuals. The detection rate of *Filifactor* bacteria in patients with CP+T2D was negatively correlated with certain features of the presumed metabolic pathways of the microbiome, which included fatty acid biosynthesis and pyrimidine metabolism.

3. The noted metabolic features, in particular, a decrease in pyrimidine metabolism correlating with the occurrence of *F. alocis*, according to the literature, with a certain degree of probability can be considered a pathogenetic factor in the development of periodontitis and/or T2D and can be regarded as a diagnostic marker.

REFERENCES

- Eke P.I., Wei L., Borgnakke W.S., et al. Periodontitis prevalence in adults ≥ 65 years of age, in the USA. *Periodontol.* 2000; 2016;72(1):76–95. DOI: <https://doi.org/10.1111/prd.12145>
- Мамедов М.Н., Куценко В.А., Керимов Э.Ф. и др. Связь состояния соматического здоровья с заболеваниями тканей пародонта и зубов в реальной клинической практике. *Профилактическая медицина.* 2022;25(2):66–73. Mamedov M.N., Kutsenko V.A., Kerimov E.F., et al. Relationship between the state of somatic health and diseases of periodontal tissues and teeth in real clinical practice. *The Russian Journal of Preventive Medicine.* 2022;25(2):66–73. DOI: <https://doi.org/10.17116/profmed20222502166> EDN: <https://elibrary.ru/xckwjl>
- Балмасова И.П., Царев В.Н., Янушевич О.О. и др. *Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов.* М.; 2021:175–225. Balmasova I.P., Tsarev V.N., Yanushevich O.O., et al. *Microecology of Periodontium. The Relationship Between Local and Systemic Effects.* Moscow; 2021:175–225. EDN: <https://elibrary.ru/myzmbu>
- Hajishengallis G., Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat. Rev. Immunol.* 2021;21(7):426–40. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00488-6>
- Nikolaeva E.N., Tsarev V.N., Tsareva T.V., et al. Interrelation of cardiovascular diseases with anaerobic bacteria of subgingival biofilm. *Contemp. Clin. Dent.* 2019;10(4):637–42. DOI: https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_84_19
- Bascones-Martínez A., Muñoz-Corcuera M., Bascones-Ilundain J. Diabetes and periodontitis: A bidirectional relationship. *Med. Clin. (Barc.).* 2015;145(1):31–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.07.019> (in Spanish)
- Portes J., Bullón B., Quiles J.L., et al. Diabetes mellitus and periodontitis share intracellular disorders as the main meeting point. *Cells.* 2021;10(9):2411. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10092411>
- Alam U., Asghar O., Azmi S., Malik R.A. General aspects of diabetes mellitus. *Handb. Clin. Neurol.* 2014;126:211–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53480-4.00015-1>
- Ida S., Kaneko R., Murata K. Utility of real-time and retrospective continuous glucose monitoring in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Diabetes Res.* 2019;2019:4684815. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4684815>
- American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes – 2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl. 1):15–33. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc21-s002>
- Patil V.S., Patil V.P., Gokhale N., et al. Chronic periodontitis in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress as a common factor in periodontal tissue injury. *J. Clin. Diagn. Res.* 2016;10(4):BC12–6. DOI: <https://doi.org/10.7860/jcdr/2016/17350.7542>
- Унаньян К.Г., Балмасова И.П., Царев В.Н. и др. Церамиды как биомаркеры хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом второго типа. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.* 2020;24(4):325–37. Unanyan K.G., Balmasova I.P., Tsarev V.N., et al. Ceramides as biomarkers of chronic periodontitis associated with type II diabetes. *RUDN Journal of Medicine. Series: Medicine.* 2020;24(4):325–37. DOI: <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2020-24-4-325-337> EDN: <https://elibrary.ru/kykdxt>
- Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии как основные факторы возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии.* 2017;94(5):101–12. Tsarev V.N.,

- Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontal pathogenic bacteria as the main factors in the occurrence and development of periodontitis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;94(5):101–12.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-101-112>
EDN: <https://elibrary.ru/ctbcar>
14. Howard K.C., Gonzalez O.A., Garneau-Tsodikova S. Porphyromonas gingivalis: where do we stand in our battle against this oral pathogen? *RSC Med. Chem.* 2021;12(5):666–704.
DOI: <https://doi.org/10.1039/d0md00424c>
15. Zhou M., Rong R., Munro D., et al. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One*. 2013;8(4):e61516.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061516>
16. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., et al. The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* 2010;192(19):5002–17.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00542-10>
17. Griffen A.L., Beall C.J., Campbell J.H., et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012;6(6):1176–85.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.191>
18. Jalava J., Eerola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999;49(Pt. 4):1375–9.
DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1375>
19. Янушевич О.О., Царев В.Н., Николаева Е.Н. и др. Первый отечественный опыт выявления ассоциации анаэробных бактерий *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis* молекулярно-биологическими методами при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (сравнительное исследование). *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2022;77(6):437–46. Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., et al. The first domestic experience of detecting the association of anaerobic bacteria *Filifactor alocis* and *Porphyromonas gingivalis* by molecular biological methods in periodontal diseases and comorbid pathology (comparative research). *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2022;77(6):437–46. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn2262>
EDN: <https://elibrary.ru/pzajok>
20. Uematsu H., Sato N., Hossain M.Z., et al. Degradation of arginine and other amino acids by butyrate-producing asaccharolytic anaerobic G am-positive rods in periodontal pockets. *Arch. Oral Biol.* 2003;48(6):423–9.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(03\)00031-1](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(03)00031-1)
21. Aruni A.W., Roy F., Fletcher H.M. *Filifactor alocis* has virulence attributes that can enhance its persistence under oxidative stress conditions and mediate invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 2011;79(10):3872–86.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.05631-11>
22. Moffatt C.E., Whitmore S.E., Griffen A.L., et al. *Filifactor alocis* interactions with gingival epithelial cells. *Mol. Oral Microbiol.* 2011;26(6):365–73.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00624.x>
23. Kim H.Y., Song M.K., Gho Y.S., et al. Extracellular vesicles derived from the periodontal pathogen *Filifactor alocis* induce systemic bone loss through Toll-like receptor 2. *J. Extracell. Vesicles.* 2021;10(12):e12157.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jev2.12157>
24. Aruni A.W., Zhang K., Dou Y., Fletcher H. Proteome analysis of coinfection of epithelial cells with *Filifactor alocis* and *Porphyromonas gingivalis* shows modulation of pathogen and host regulatory pathways. *Infect. Immun.* 2014;82(8):3261–74.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.01727-14>
25. Fine D.H., Markowitz K., Fairlie K., et al. A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasan-*
guinis and *Filifactor alocis* are present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(9):2850–61.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.00729-13>
26. Aja E., Mishra A., Dou Y., Fletcher H.M. Role of the *Filifactor alocis* hypothetical protein FA519 in oxidative stress resistance. *Microbiol. Spectr.* 2021;9(3):e0121221.
DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01212-21>
27. Armstrong C.L., Miralda I., Neff A.C., et al. *Filifactor alocis* promotes neutrophil degranulation and chemotactic activity. *Infect. Immun.* 2016;84(12):3423–33.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00496-16>
28. Aruni A.W., Mishra A., Dou Y., et al. *Filifactor alocis* a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect.* 2015;17(7):517–30.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.011>
29. Graetz C., Mann L., Krois J., et al. Comparison of periodontitis patients' classification in the 2018 versus 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* 2019;46(9):908–17.
DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13157>
30. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2012;35(Suppl. 1):S64–71.
DOI: <https://doi.org/10.2337/dc12-s064>
31. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 2016;13(7):581–3.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
32. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database):D590–6.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
33. Tang Z.Z., Chen G., Alekseyenko A.V. PERMANOVA-S: association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. *Bioinformatics.* 2016;32(17):2618–25.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw311>
34. Langille M.G., Zaneveld J., Caporaso J.G., et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):814–21.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
35. Parks D.H., Tyson G.W., Hugtholtz P., Beiko R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics.* 2014;30(21):3123–4.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
36. Saeb A.T.M., Al-Rubeaan K.A., Aldosary K., et al. Relative reduction of biological and phylogenetic diversity of the oral microbiota of diabetes and pre-diabetes patients. *Microb. Pathog.* 2019;128:215–29.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.009>
37. Casarin R.C., Barbagallo A., Meulman T., et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J. Periodontol. Res.* 2013;48(1):30–6.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x>
38. Tam J., Hoffmann T., Fischer S., et al. Obesity alters composition and diversity of the oral microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus independently of glycemic control. *PLoS One.* 2018;13(10):e0204724.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204724>
39. Tang B., Yan C., Shen X., Li Y. The bidirectional biological interplay between microbiome and viruses in periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Front. Immunol.* 2022;13:885029.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.885029>
40. Ganesan S.M., Joshi V., Fellows M., et al. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *ISME J.* 2017;11(9):2075–89.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.73>
41. Uematsu H., Sato N., Hossain M.Z., et al. Degradation of arginine and other amino acids by butyrate-producing asaccharolytic

- tic anaerobic Gram-positive rods in periodontal pockets. *Arch. Oral Biol.* 2003;48(6):423–9.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(03\)00031-1](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(03)00031-1)
42. Cueno M.E., Ochiai K. Gingival periodontal disease (PD) level-butyric acid affects the systemic blood and brain organ: Insights into the systemic inflammation of periodontal disease. *Front. Immunol.* 2018;9:1158.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01158>
43. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014;35(1):3–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
44. Imai K., Ogata Y. How does Epstein-Barr virus contribute to chronic periodontitis? *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(6):1940.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21061940>
45. Li Y., He J., He Z., et al. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J.* 2014;8(9):1879–91.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.28>
46. Fang Y., Xu J., Li Z., et al. Design and synthesis of novel pyrimido[5,4-d]pyrimidine derivatives as GPR119 agonist for treatment of type 2 diabetes. *Bioorg. Med. Chem.* 2018;26(14):4080–7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.06.035>

Information about the authors

Tatyana V. Tsareva — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of microbiology, virology, immunology, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

Oleg O. Yanushevich — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Full Member, Head, Department of periodontology, Rector, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0059-4980>

Viktor N. Tsarev — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of microbiology, virology, immunology, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, [nikola777@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-3311-0367](https://orcid.org/0000-0002-3311-0367)

Irina P. Balmasova — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of pathogenesis and methods of treatment of infectious diseases, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

Author contribution. *Tsareva T.V.* — collection of biomaterial from patients, conducting molecular genetic studies, bioinformatic and statistical analysis, writing the text of the article; *Yanushevich O.O.* — general guidance, organization of patient groups and collection of clinical biomaterial, reading and editing the article; *Tsarev V.N.* — research design, conducting microbiological and molecular genetic studies of biomaterial, database analysis the obtained data of genetic research; *Balmasova I.P.* — interpretation of literary data, conducting molecular genetic studies of biomaterial, bioinformatics analysis, writing the text of the article. All authors confirm that they met the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, revised the work, made final approval of the version to be published.

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 02.09.2023;
accepted for publication 27.11.2023;
published 28.11.2023

Информация об авторах

Царева Татьяна Викторовна — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

Янушевич Олег Олегович — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. каф. пародонтологии, ректор МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0059-4980>

Царев Виктор Николаевич — д.м.н., профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, [nikola777@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-3311-0367](https://orcid.org/0000-0002-3311-0367)

Балмасова Ирина Петровна — д.м.н., профессор, зав. лаб. патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

Участие авторов. *Царева Т.В.* — сбор биоматериала от пациентов, проведение молекулярно-генетических исследований, биоинформационный и статистический анализ, написание текста статьи; *Янушевич О.О.* — общее руководство, организация групп пациентов и сбора клинического биоматериала, прочтение и редактирование статьи; *Царев В.Н.* — дизайн исследования, проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований биоматериала, анализ базы полученных данных генетических исследований; *Балмасова И.П.* — проведение молекулярно-генетических исследований биоматериала, биоинформационный анализ, интерпретация данных литературы, написание текста статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 02.09.2023;
принята к публикации 27.11.2023;
опубликована 28.11.2023

REVIEWS

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-446>



Accumulated experience and future prospects of *in vivo* hepatitis B virus research

Aleksey M. Nagornykh[✉], Marina A. Tyumentseva, Aleksandr I. Tyumentsev, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Nowadays, an estimated more than 300 million people live with hepatitis B virus (HBV) infection globally. One of the main goals of the World Health Organization (WHO) is to eliminate viral hepatitis by the year 2030. The study of the pathogenic and immunologic properties of HBV, as well as therapeutic substances and treatment regimens, is significantly complicated by the insufficient number of susceptible biological test subjects (animal models) and the lack of zoonotic reservoirs of the virus. In this regard, researching the properties of HBV and related hepadnaviruses provides invaluable material for understanding the biology of the pathogen and the developing methods of prevention and control of this chronic infectious disease, leading to severe hepatopathies (cirrhosis and hepatocellular carcinoma).

Furthermore, prolonged HBV viremia leads to depletion of the immune system, reducing resistance against pathogens of other infections, especially those with a chronic course and socially determined spread.

The aim of this research is to evaluate existing animal models of HBV infection in the context of pathogenesis, immunologic and pathomorphological features. For the first time, the hypothesis of the possible use of certain models for the research of HBV-associated socially significant infections is considered from the point of view of the development of pathomorphological features.

To complete this review, we analyzed the information about the features of HBV infection models *in vivo*, published over the last 25 years in open sources (Web of Science, PubMed, Scopus, ScienceDirect, Springer). The main criteria for literature selection were the type of infecting agent, the observed immunologic features of the course of the infectious process and the availability of a description of the pathomorphological features in model organisms.

Keywords: *Hepatitis B virus, animal models, pathomorphological features, review*

Funding source. The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under a grant in the form of a subsidy for the establishment and development of the "World Genomic Research Center to ensure biological safety and technological independence within the framework of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies", Agreement No. 075-15-2019-1666.

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

For citation: Nagornykh A.M., Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Akimkin V.G. Accumulated experience and future prospects of *in vivo* hepatitis B virus research. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(6):495–510.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-446>

EDN: <https://www.elibrary.ru/zxggy1>

Обзорная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-446>

Накопленный опыт и перспективы исследования вируса гепатита В *in vivo*

Нагорных А.М.[✉], Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

На сегодняшний день в мире более 300 млн человек инфицированы вирусом гепатита В (HBV), а одной из целей ВОЗ является ликвидация вирусного гепатита к 2030 г. Изучение патогенных и иммунологических свойств HBV, а также терапевтических субстанций и схем его лечения существенно осложнено отсутствием достаточного количества восприимчивых биологических тест-систем (животных моделей) и зоонозных резервуаров вируса. В связи с этим изучение свойств HBV и родственных ему гепаднавирусов даёт бесценный материал для понимания биологии возбудителя и разработки методов профилактики и борьбы с этим хроническим инфекционным заболеванием, приводящим к тяжёлым гепатопатиям (цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома).

Кроме того, продолжительная виремия HBV приводит к истощению иммунной системы, снижая резистентность против возбудителей других инфекций, особенно имеющих хроническое течение и социально обусловленное распространение.

Цель работы — оценка существующих животных моделей инфекции HBV в контексте патогенеза, иммунологических и патоморфологических характеристик. Впервые с позиции развития патоморфологических особенностей рассматривается гипотеза возможного использования некоторых моделей для изучения сочетанных с HBV социально значимых инфекций.

Для подготовки статьи использовалась информация об особенностях моделирования инфекции HBV *in vivo*, опубликованная за последние 25 лет в открытых источниках (Web of Science, PubMed, Scopus, ScienceDirect, Springer). Основными критериями для подбора литературы были тип инфицирующего агента, наблюдаемые иммунологические особенности течения инфекционного процесса и наличие описания патоморфологической картины у модельных организмов.

Ключевые слова: вирус гепатита В, животные модели, патоморфологические характеристики, обзор

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.

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

Для цитирования: Нагорных А.М., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Акимкин В.Г. Накопленный опыт и перспективы исследования вируса гепатита В *in vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):495–510.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-446>EDN: <https://www.elibrary.ru/zxggyl>

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is a small enveloped hepatotropic DNA virus. HBV has a relaxed partially double-stranded circular DNA genome of approximately 3200 bases in length with 4 major overlapping open reading frames (ORF): pre-S/S, pre-C/C, X and P [1, 2]. The pre-S/S ORF encodes 3 structural envelope proteins: large (L), medium (M) and small (S). The S protein, known as HBsAg, consists of 226 amino acids. The pre-C/C ORF encodes 2 proteins: Core (core protein), also known as hepatitis B core antigen (HBcAg) forms the nucleocapsid; pre-Core (pre-core protein) is produced as a result of the translation initiation from alternate sites within the pre-C/C HBV ORF. The X ORF encodes a small regulatory X protein that is required for viral replication. Finally, the P ORF encodes a viral DNA polymerase [3], which is also a specialized reverse transcriptase required for the replication of HBV genomic DNA via an intermediate RNA [4].

HBsAg is a surface antigen and the main marker of HBV infection. In acute hepatitis, HBsAg can already be detected in the blood during the incubation period within the first 4–6 weeks from the onset of the clinical period. The presence of HBsAg for more than 6 months is considered a factor in the disease transition to the chronic stage. It should be noted that only part of HBsAg proteins formed during virus reproduction, is used for the construction of new viral particles, while the rest of the antigen enters the blood of the infected host [5].

HBcAg is a core antigen detectable only in the nuclei of hepatocytes, but is absent in the bloodstream. The detection of IgM antibodies to this antigen in the blood is of great diagnostic importance. These antibodies in acute hepatitis are detected earlier than antibodies for other viral antigens. Anti-HBcIgM are detected in 100% of patients with acute hepatitis B, while the total anti-HBc antibodies may be the only marker of HBV in the so-called "window period", when neither HBsAg, nor antibodies to it could be detected in the bloodstream. Because of this, they are detected at blood transfusion centers when testing donated blood and plasma [6].

HBcAg and HBsAg are the major structural antigens of HBV. Both antigens are potent immunogens for animal models as well as humans infected with HBV [7].

HBV protein X (HBx) is a pleiotropic regulatory protein [8]. Its role in viral replication has been demonstrated in a number of *in vitro* and *in vivo* studies. HBx was first identified as a transactivator of gene expression. HBx does not bind DNA elements directly, but attaches to proteins that are responsible for binding DNA. HBx moderately stimulates transcription driven by a wide range of promoters, including its own enhancer in the context of the entire viral genome [9]. However, the role of HBx and its induced gene transcription, as well

as its impact on cytoplasmic signaling pathways during natural HBV infection, remains up for debate [10].

After the virus enters the cell, the HBV capsid is transported to the nucleus where the viral DNA is released. In the nucleus, the incomplete viral DNA genome with the help of cellular enzymes is reconstituted into covalently closed circular DNA (cccDNA), which then serves as a template for HBV gene transcription [11]. The disease is associated with the formation of infectious virions as well as overexpression of viral proteins.

HBV has a strict tropism to its host and organs. It attaches to heparan sulfate proteoglycans and is absorbed upon binding to sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). NTCP is a hepatocyte-specific bile acid transporter and has been identified as a high-affinity HBV receptor.

Ex vivo expression of human NTCP (hNTCP) in mouse, rat and dog hepatocytes enables HBV entry into cells, but the virus is then blocked at one or more stages of its life cycle [12]. However, hNTCP expression in the hepatocytes of pigs, cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*) allows HBV to undergo a complete replication cycle. It is likely that additional host factors are required to import incomplete HBV genomes into the nucleus or to reconstitute them to a persistent form of cccDNA [13].

HBV is a member of the *Hepadnaviridae* family, which includes other hepatotropic enveloped DNA viruses such as Duck hepatitis B virus (DHBV), Woodchuck hepatitis virus (WHV) and Woolly monkey hepatitis B virus (WMHBV). DHBV, WHV and WMHBV are widely used as surrogate models of HBV infection. Mammalian hepadnaviruses, including HBV, are members of the *Orthohepadnavirus* genus and lead to the development of liver pathologies, while DHBV belongs to the *Avihepadnavirus* genus, though infection with this virus does not lead to the development of hepatopathies.

Surrogate animal models of HBV

Ducks

In 1980, DHBV was detected in the serum of domestic ducks and became an instrumental model for understanding the life cycle of hepadnaviruses [14]. In duck hepatocyte cultures, this model has played a key role in elucidating the mechanisms of viral replication, including viral capsid assembly, initiation of reverse transcription and finally formation of double-stranded relaxed circular DNA [15–19]. Using this model, the stages of cccDNA formation were investigated [20–22]. Duck models with persisting DHBV infection have also been used extensively to evaluate antiviral drugs, nucleocapsid assembly inhibitors and combined therapy (Fig. 1) [23–25].

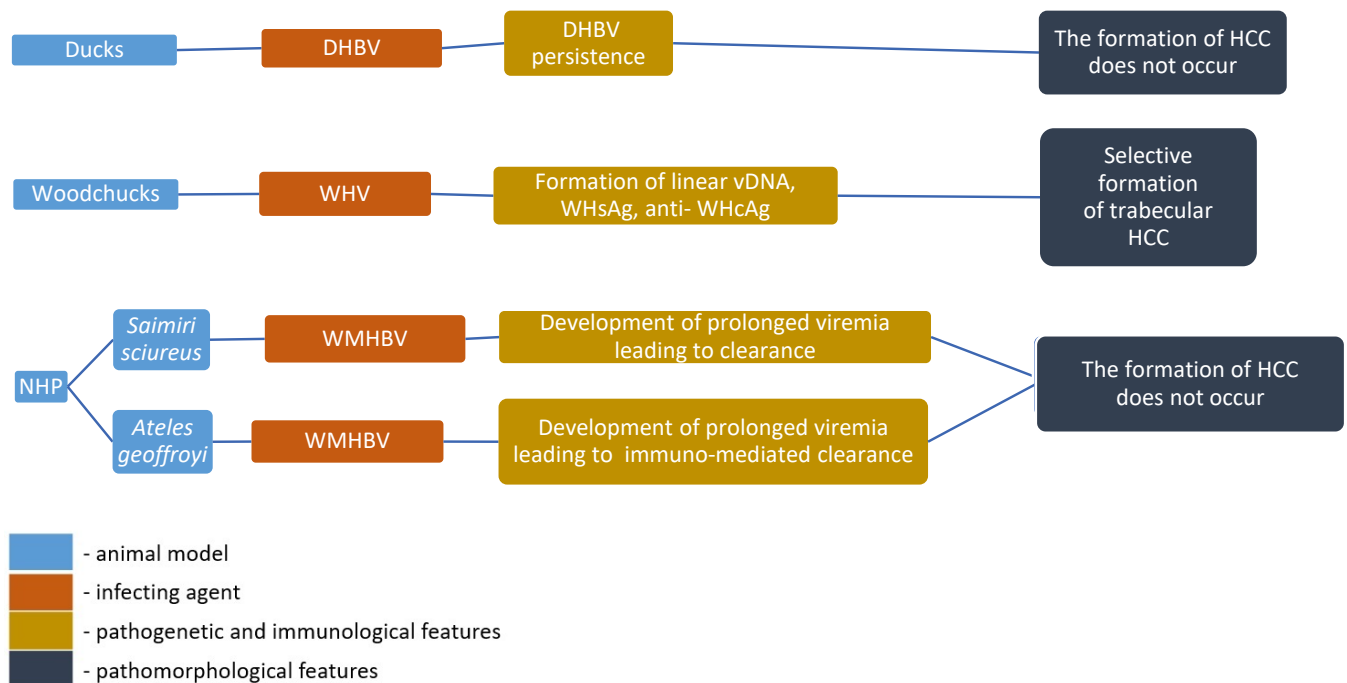


Fig. 1. Pathogenesis, immunological and pathological characteristics of animal models of HBV infection based on surrogate viruses.

Nevertheless, duck models based on DHBV still greatly differ from human HBV in the following aspects: DHBV is only 40% homologous to human HBV [26], DHBV uses carboxypeptidase D as an entry receptor [27], furthermore, drug toxicity may manifest differently in humans and ducks [28, 29]. Therefore, screening of candidate drugs as well as mechanism studies using this system may require further validation due to the existing differences between viruses and hosts.

Woodchucks

The discovery of WHV, which infected woodchucks (*Marmota monax*) at the Philadelphia Zoo [30], provided new opportunities for studying the host response to hepadnaviruses *in vivo*. WHV is similar to HBV not only in virological features such as length, organization, and nucleotide sequence of the genome (the similarity reaches 60-70%), but also in innate and adaptive host immune responses that occur during viral infection [31].

Currently, two species of woodchucks are used as animal models for HBV-related studies: *Marmota monax* [32, 33] and *Marmota himalayana* [34]. The course of infection, pathogenesis and disease progression in WHV-infected woodchucks are similar to HBV infection in humans. Consequently, the woodchuck model is widely used for preclinical studies of antiviral drugs as well as studies of HBV-induced hepatocellular carcinoma (HCC). As preclinical models, infected woodchucks have been tested for susceptibility to antiviral drugs such as nucleos(t)ide analogs including lamivudine [35], entecavir [36], and tenofovir [37]. Infection of

newborn woodchucks usually results in chronic infection, whereas adult woodchucks usually develop acute hepatitis, indicating a similar immune response against HBV infection in humans. This has made it possible to use woodchucks as an animal model of HBV for the development of prophylactic vaccines and screening of immunotherapeutic drugs against HBV infection [15, 16, 32, 33]. In particular, the *Marmota himalayana* model has shown that the use of nucleoside analogs alone or in combination with DNA vaccine can induce a partial or complete immune response, preventing viremia after WHV infection [38].

Nevertheless, there are certain limitations when conducting research on the woodchuck model. Firstly, the woodchucks are a large animals and can be difficult to handle during experimental procedures. Secondly, there are a limited amount of reagents available to study the immune response of woodchucks to viral infection. Furthermore, HBV- and WHV-mediated carcinogenesis differ, as WHV DNA often integrates into the *Myc* proto-oncogene, resulting in the development of HCC in almost all neonatally infected woodchucks, whereas HBV prefers to integrate into the *TERT*, *MLL4* and *CTNNB1* genes [39]. Thus, the differences between HBV and WHV viruses and their effects on their respective hosts should be taken into account to evaluate the efficacy of potential therapeutic agents and vaccines against HBV.

Bats

Metagenomic analysis of tissue samples from bat populations revealed numerous hepadnavirus-like se-

quences showing more than 70% homology with WHV and HBV genome sequences [40]. Whole-genome sequencing of tissue samples from bats living in Panama and Gabon also revealed the presence of hepadnaviruses in these populations, but zoonotic potential was only confirmed in New World bats. This virus was capable of infecting human hepatocytes via hNTCP and cross-reacted with monoclonal antibodies against the S-domain of HBsAg. Histopathologic examination indicated a slight to moderate presence of lymphocytic as well as scant neutrophilic-eosinophilic infiltrates in the portal triads of infected animals [41]. The presence of HBx suggests the potential development of HCC in infected bats. However, the detection of antibody-positive and DNA-negative bats combined with high seroprevalence in the same research indicates that bats are possibly able to clear this infection.

The use of bats as a model organism for HBV studies is costly and time consuming due to the importance of arranging for the animal care and maintenance in an isolated vivarium. Furthermore, bat hepadnaviruses are insufficiently studied. However, the question of modeling HBV infection in bats is open to debate, given the migratory nature of these animals.

Non-human primates

Another HBV-like virus, WMHBV, infects its natural host, the woolly monkey (*Lagothrix lagotricha*) [42]. WMHBV has been successfully used in various studies on spider (*Ateles geoffroyi*) and squirrel (*Saimiri sciureus*) monkeys. An infectious WMHBV clone was developed for studies in spider monkey models, resulting in moderate viremia (10^4 – 10^5 genomic equivalent per 1 ml) 8 weeks after inoculation followed by immune-mediated clearance [28]. Woolly and spider monkeys are endangered and are unavailable for HBV-related studies for ethical reasons [43, 44]. Nevertheless, HBV models based on non-human primates may be promising. For example, squirrel monkeys infected with WMHBV have shown acute infection and in some cases chronic infection when WMHBV genomes were delivered using adeno-associated viruses [45]. It has been shown that in squirrel monkeys infected with WMHBV, viremia lasts 6–8 months, which is more than 2 times longer than the duration of viremia in other non-human primates. This fact allows us to consider them as a surrogate model for the development of therapeutic approaches for HBV treatment [45].

In 2013, a single naturally transmissible HBV strain 99% identical to the HBV genotype D (ayw) strain was detected in a population of cynomolgus monkeys on the island of Mauritius (mcHBV), which raised some hopes of creating an HBV model based on the small Old World monkey [46]. So far, however, it has not been possible to obtain productive infection of cynomolgus monkeys with mcHBV, despite them being inoculated with high doses [47].

After hNTCP was identified as a functional HBV receptor, researchers discovered that it is a key host factor limiting HBV infection in cynomolgus monkeys and rhesus macaques [13]. hNTCP differs from primate NTCP by only five amino acid residues in the HBV binding region. However, a difference at one of these divergent amino acid residues (G158R) results in an inability to bind HBV to primate NTCP. The induction of a corresponding mutation in the primate NTCP gene resulted in HBV susceptibility [48]. In order to develop a new virus model that provides susceptibility to HBV, the R158G mutation could be induced into macaque NTCP using the CRISPR/Cas genome editing system.

Furthermore, an HBV model based on rhesus macaques transduced with a viral vector to express hNTCP *in vivo* was developed [47]. The addition of a viral vector followed by HBV infection resulted in sustained HBV viremia for at least 6 weeks. Humoral and antiviral cellular immunity were generated in the model animals, and cccDNA was expressed in hepatocytes of rhesus macaques during infection. However, the level of hNTCP expression in rhesus macaques remains at a low level and therefore, this model of HBV infection is not considered effective (only 0.5–1.0% of hepatocytes are HBcAg-positive, while HBsAg is not detected in blood) [47].

The above data inspire the development of other HBV models based on non-human primates which would be capable of demonstrating a higher efficiency of HBV infection.

Immunotolerant animal models of HBV

Transgenic mice

Since 1985, transgenic mouse models expressing HBV proteins (such as HBsAg [49], HBeAg [50] or HBx [51]) have been developed to study their role in pathogenesis or study the full-length HBV genomes that can produce infectious HBV virions in mouse hepatocytes [52–55]. These models have contributed immensely to the identification of oncogenic functions of HBsAg and the HBx protein that induce inflammation, alter host gene expression and ultimately lead to the development of HCC [51, 56].

Transgenic mice expressing HBeAg are immunologically tolerant not only to HBeAg, but also to HBcAg, however, they are capable of transplacental transmission of HBeAg. It is shown that the nonchimeric offspring of such animals after birth demonstrate a reduced T-cell response to HBcAg. All of this indicates that at the early stage of infection, HBeAg plays a crucial role in limiting the T-cell response to HBcAg and contributes to the transition of the process into a chronic course of the disease. While HBcAg expression causes no obvious pathomorphological changes in these mice, enhanced HBeAg expression inhibits its release, leading to the formation of acidophilic inclusions

in the cytoplasm and causing focal nodular hyperplasia of the liver. The cells with acidophilic inclusions, in turn, resemble the ground-glass hepatocytes in HBV carriers [57].

Transgenic mice expressing HBxAg in liver tissue under the control of its native promoter have been used to establish the oncogenic potential of HBxAg. Due to HBxAg not being expressed in all hepatocytes, not all animals develop HCC. In certain mice, only moderate nuclear pleomorphism and increased mitotic hepatocytic activity of a non-inflammatory nature is observed, multifocal hepatolipidosis also occurs (**Fig. 2**). It is worth noting that disease progression and death are observed in males earlier than in females [58].

Transgenic mice with integrated full-length HBV genomes capable of producing HBV virions in peripheral blood have also been used to test the efficacy of antiviral drugs such as lamivudine and entecavir, as well as to evaluate the antiviral effects of therapeutic drugs based on small interfering RNA [59, 60].

Transgenic mice have an immune tolerance to HBV because the virus genome is integrated into the mouse genome [61]. Nevertheless, transgenic mice have been used to study the antiviral effects of the interferon inducer [62] and the toll-like receptor 7/8 ago-

nist [54]. Furthermore, transplantation of immune cells from naive mice to transgenic mice can provoke the development of an immune response to HBV [63-65].

Transduced mice

The main method of transduction of mouse hepatocytes *in vivo* is hydrodynamic injection, which involves the rapid (6-8 s) injection of a large number of genetic constructs containing the HBV genome into the tail vein under high pressure [66]. This causes hepatocyte damage, which entails a post-injection increase in alanine transaminase levels to large values, but after transduction, HBV replication is temporary [67]. Hepatocyte transduction *in vivo* is accomplished using plasmid DNA, adenoviral (Adv) or adeno-associated viral vectors. Transduction with high doses of Adv has been shown to induce temporary antigenemia [68] and HBV replication for 3 months. This is followed by a strong immune response against the adenovirus itself [67]. Transduction with adeno-associated viruses results in an immune tolerant phenotype with prolonged antigenemia, minimal inflammation and liver fibrosis [69].

The use of plasmid DNA reduces the risks of strong immune responses against viral vehicles [70]. The formation of antigens, viral transcripts and DNA

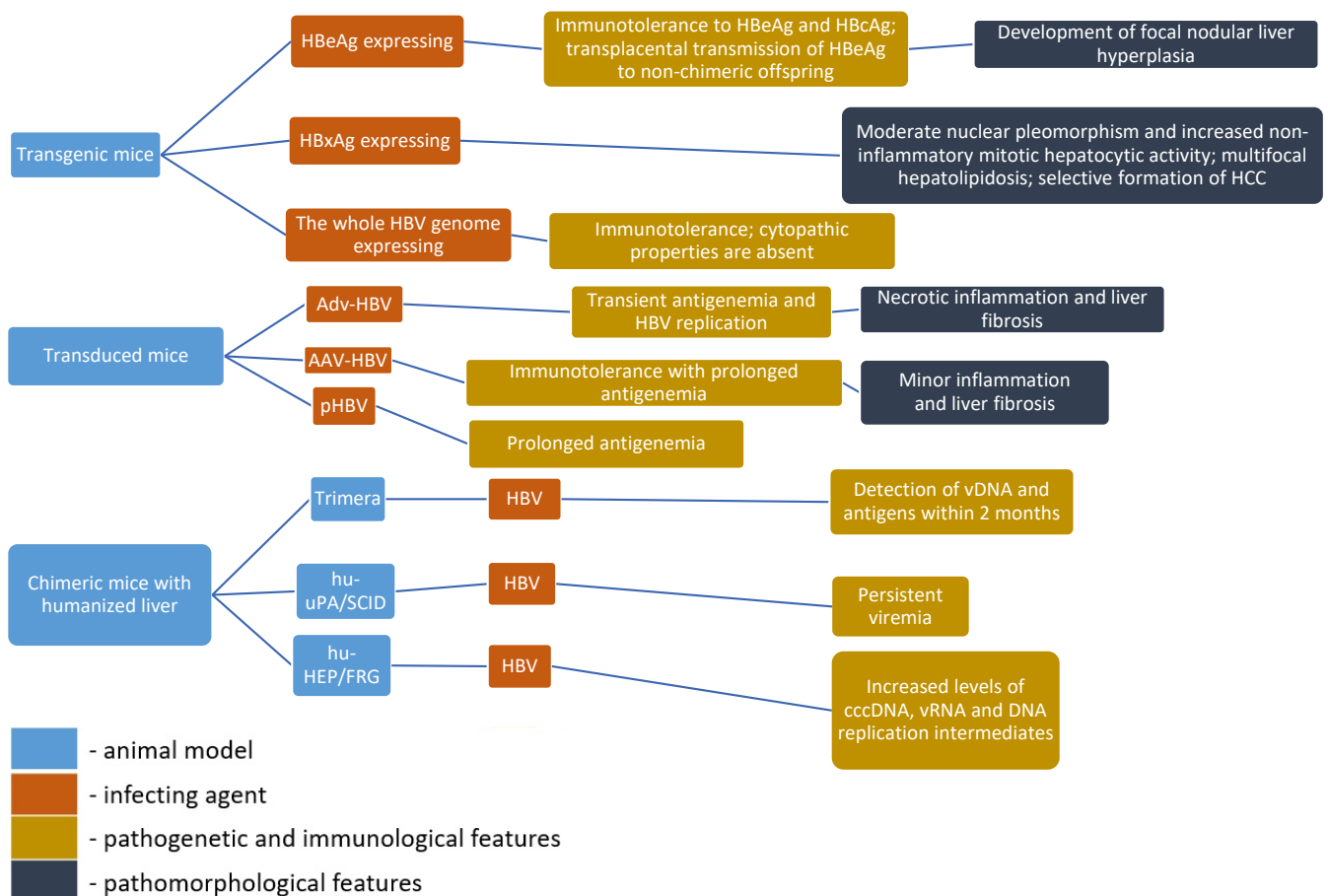


Fig. 2. Pathogenesis, immunological and pathological characteristics of immunotolerant animal models of HBV infection.

synthesis lasts for 14 days in immunocompetent animals. This is associated with the development of a T-cell immune response aimed at destroying infected hepatocytes. It is important to note that in immunodeficient NOD/SCID mice, the same process lasts for 81 days after transduction [70].

Optimization of the carrier containing the HBV genome extended the duration of antigenemia in immunocompetent mice up to 6 months. Due to this, HBsAg-positive mice produced antibodies against HBcAg, but not against HBsAg, resembling the pattern of the immune tolerant phase of infection in human carriers. Transfer of HBcAg-specific immune cells promoted the elimination of HBsAg from the serum of mice carriers, demonstrating the critical importance of the immune response against HBcAg in eliminating HBV persistence [71].

A crucial role in HBV persistence *in vivo* is played by cccDNA, which is responsible for viral recurrence in chronically infected patients. It should be noted that cccDNA is unable to infiltrate into hepatocyte nuclei of unmodified mice. Using Adv, an HBV recombinant cccDNA (rcccDNA) incapable of replication was successfully delivered to the liver of Alb-Cre transgenic mice and remained stable for more than 62 weeks, resulting in HBV persistence. The persistent non-blood inflammatory response and liver fibrosis found at the late stage of virus persistence were similar to lesions in the progressive course of chronic hepatitis B (CHB) infection in humans [72]. A similar hepatotropic rcccDNA model was established in the same mice via adeno-associated virus 8. The model was characterized by more than 72 weeks of antigenemia and cccDNA persistence for more than 51 weeks. In contrast to the previous model, minor parenchymatous inflammation and focal fibrosis were observed in the liver [73].

Thus, it is quite evident that the approach of HBV transduction of mice mediated by viral vectors and plasmid DNA is suitable for further use in HBV immunotolerance studies. Moreover, delivery of adeno-associated virus-HBV vectors to mice induced histopathologic manifestations consistent with liver fibrosis, which is characteristic of the HBV infection [74]. However, this issue has yet to be fully investigated.

Chimeric mice with humanized livers

Transgenic and transduced mice do not support a full-scale infection due to the absence of the hNTCP receptor. The Trimer model is the result of the earliest attempts of improving existing mouse models of HBV. To develop this model, fragments of infected human liver were transplanted into immunodeficient mice under the renal capsule. After engraftment, viral DNA and antigens were detectable for 2 months [75]. This model was used to evaluate antiviral drugs, despite its limited applicability to other HBV research tasks due to the relatively short time window for infection and

the transient viremia. In another simple model, partially immunodeficient *Nude* mice were subcutaneously transplanted with HepAD38 cells, capable of inducible HBV production. Sustained viremia developed 21 days after the subcutaneous neoplasm was formed and persisted for 30 days [76].

An alternative to the Trimer model involves using mice with liver-specific expression of the urokinase-type plasminogen activator (uPA). Such animals are characterized by increased uPA concentration, hypofibrinogenemia and neonatal hemorrhages. Expression of the *uPA* gene induces hepatocyte necrosis in young mice and provides marked repopulation of about 87% of liver parenchyma after 9 weeks [77]. Despite sustained viremia, ground-glass hepatocytes are not detected in such animals [78]. The hu-uPA/SCID model is widely used to evaluate antiviral drugs and investigational immune therapy regimens. It is also used to study the mechanism of the innate immune response against HBV. The main disadvantage of this model is the uncontrolled expression of the *uPA* gene, which requires xenotransplantation of hepatocytes in the neonatal period, as well as an increased risk of extensive hemorrhage in model animals [79].

In 2018, G. Dalton et al. introduced *Fah* gene knockout mice. These animals significantly solved the problem of the hu-uPA/SCID model. The lack of the *Fah* gene causes accumulation of toxic metabolic intermediates of phenylalanine catabolism to tyrosine and induction of liver failure is regulated by administration of 2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione [80]. Based on this feature, several models have been established, including FRG mice carrying a genotype with the knockout of *Fah*, *Rag2* and *IL-2ry* genes. These mice achieved 95% liver repopulation with human hepatocytes [81, 82]. After HBV infection, increased levels of cccDNA, vRNA and viral DNA replication intermediates were observed in hu-HEP/FRG mice. The hu-HEP/FRG model has been successfully used to study the pathogenesis of HBV [82] and evaluate the efficacy of antiviral drugs and therapeutic regimens [83].

Immunocompetent animal models of HBV

Tupaia

Tupaia (*Tupaia belangeri*) are small mammals that are genetically more closely related to primates than to rodents [84]. Tupaia are susceptible to HBV and HCV experimental infections, which has led them to become a non-primate animal model studied in recent decades [85, 86]. Similar to other species, tupaia have a greater propensity to develop chronic disease when infected as newborns and show similar histopathologic changes in the liver as those seen in humans infected with HBV [83]. Primary tupaia hepatocytes are widely available and used in HBV and WMHBV infections [87, 88].

Due to the primary cell culture of tupaia hepatocytes, accurate mapping of the HBV binding site became possible and NTCP was identified as its functional receptor [12]. Intraperitoneal inoculation of HBV into newborn animals leads to HBsAg persistence in the liver accompanied by short-term HBsAg- and HBeAg-antigenemia, while intrahepatic transduction of recombinant viral DNA leads to the emergence of serum antibodies against HBsAg and HBcAg and the development of chronic hepatitis ending in fibrosis in certain individuals [89]. In adult tupaia, intravenous or intraperitoneal infection leads to a rapid increase in antibody titers against HBcAg, HBsAg and HBeAg within 2-3 weeks. Histopathologic changes in the liver of chronically infected animals are similar to those observed in human HBV [89], including HCC formation at the late stage of life in 30% of animals (Fig. 3). Nonetheless, no increase was observed in the levels of serum transaminases in tupaia [90].

Nowadays, there are a number of caveats that limit the applicability of tupaia as an animal model of HBV. First, being outbreed, tupaia have genetic heterogeneity that may be useful for real-world studies, but is not acceptable for large-scale animal studies. Second, only

low titers of virus are detectable *in vivo* in tupaia. Lastly, there is an acute shortage of tools and materials to investigate HBV in this species.

Chimeric mice with humanized immune systems and livers

A significant disadvantage of chimeric mice with humanized livers is their high immunodeficiency background. To enable analysis of the human immune response to HBV, virus-induced immunopathogenesis and testing of immunomodulators for the treatment of CHB infection, protocols for the co-grafting of human hepatocytes and human immune cells into mice are constantly being updated and improved.

Reconstitution of the human immune system is achieved by intrahepatic injection of newborn NSG mice carrying the HLA-A2 allele with human hematopoietic CD34⁺ stem cells (hCD34⁺). The hCD34⁺ together with human liver progenitor cells repopulate mouse livers damaged by agonistic antibodies against CD95. This model achieves 25% humanization, HBV persistence with low viral load (< 5 × 10⁵ copies/mL), and the development of an HBV-specific hCD8⁺ T-cell response. The accumulation of M2-like macrophages,

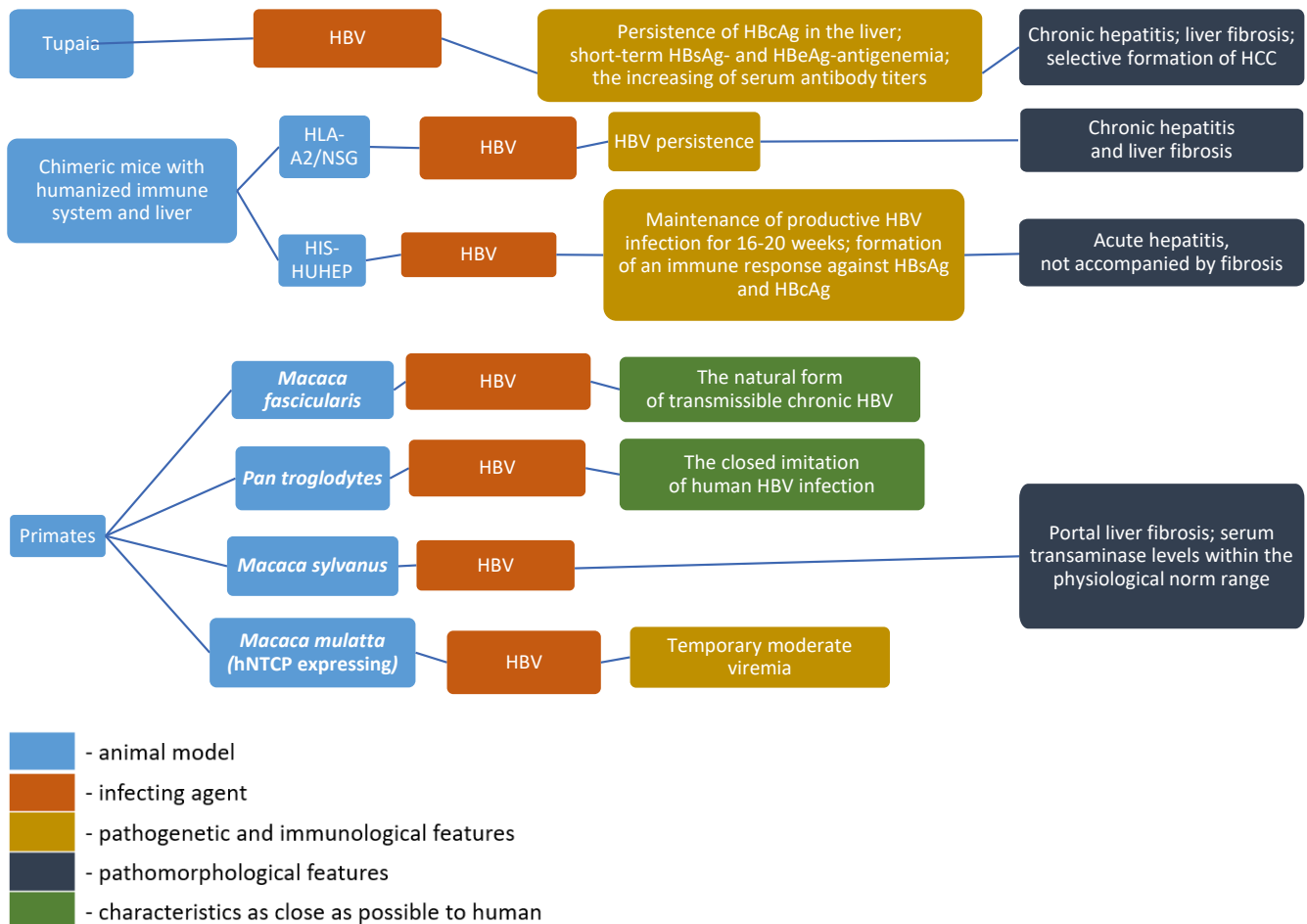


Fig. 3. Pathogenesis, immunological and pathological characteristics of immunocompetent animal models of HBV infection.

which contribute to accelerated liver fibrosis in HBV patients, leads to the development of severe hepatitis and fibrosis in mice [91].

Another model, HIS/hu-HEP, is developed by engrafting hCD34⁺ cells and adult human hepatocytes into BALB/c Rag2^{-/-}IL2ry^{-/-} Sirpa NOD Alb-uPA^{tg/tg} mice. HIS/hu-HEP is characterized by higher levels of HBV antigen production and the development and maintenance of productive infection for 16–20 weeks. Infection of animals of this model leads to infiltration of inflammatory cells into areas containing antigen-positive hepatocytes without subsequent formation of foci of fibrosis. At the same time, exposure to small doses of HBsAg and HBcAg antigens induces a stronger immune response [92].

The FRGS (Fah^{-/-}Rag2^{-/-}IL-2Rγc^{-/-} SCID) mice are also used to develop chimeric mice with humanized immune system and liver. This is done by intrasplenic transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells. As a result, after 12 weeks, human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocytes directly in the liver of the mice. Furthermore, hCD45⁺ cells repopulate bone marrow, thymus, lymph nodes, liver and are found in the peripheral blood of model animals to varying degrees. After infection, persistent HBV infection with high viral load and antigenemia develops, attracting a large number of inflammatory cells to the liver parenchyma. The pathomorphological signs of acute lobular hepatitis with the formation of lymphoid aggregates and ductal lesions appears 12 weeks after infection, and the portal and periportal lymphocytic infiltration characteristic of HBV is detected from week 24. The formation of diffuse scars and areas of focal nodular hyperplasia in the liver, as well as elevated levels of serum γ-glutamyltranspeptidase and hyaluronic acid, persist for 36 weeks after infection. Taken together, such liver changes in animals are similar to some pathomorphological features of the CHB infection in humans. Moreover, 10% of infected animals develop cirrhosis, which resembles the natural history of CHB infection in humans [92].

Chimeric mice with humanized immune systems and livers represent a new type of animal models of HBV. Such models successfully reproduce the natural progression of HBV infection and thus offer opportunities to understand the pathophysiology of viral immunity and improve intervention strategies for HBV-related liver disease.

Primates

The chimpanzee is the only known immunocompetent model that is fully susceptible to HBV and can reproduce pathogenesis and disease progression quite accurately. It has been shown that even 1 genomic equivalent of HBV DNA is sufficient to successfully infect chimpanzees [93]. After injection of HBV ob-

tained from patients with CHB infection, chimpanzees can develop acute and chronic disease with immune response and inflammation profiles very similar to those of HBV-infected patients [94].

In the early stages of HBV research, the chimpanzee model played an important role in evaluating the safety and efficacy of HBV vaccines under development. Chimpanzee studies were used to test the efficacy of the first-generation HBV vaccine (derived from blood plasma) and a later developed recombinant vaccine containing HBsAg produced in yeast cells [94, 95]. In recent years, the efficacy of modified recombinant vaccines, vaccines against antiviral drug-resistant mutant variants of HBV, and some therapeutic vaccination studies have also been tested using a chimpanzee model [96–98].

Chimpanzees seem to be indispensable as an immunocompetent animal model in immunity studies due to the fact that they can reproduce the same liver inflammation and cellular immune responses as in HBV-infected patients. Studies in chimpanzees have shown that non-cytopathic antiviral mechanisms mediated by pro-inflammatory cytokines can promote viral clearance during acute viral hepatitis [99]. More recently, studies in chimpanzee models of CHB infection have shown that immune modulation can enhance antiviral immunity and suppress HBV replication (e.g., through TLR-7 agonist activation) [100]. Although chimpanzees have historically been the most relevant animal species for HBV research, limited availability, high costs and serious ethical concerns have limited their use as an experimental model.

Besides chimpanzees, other primate models have been used to study HBV. For example, Barbary macaques (*Macaca sylvanus*) transduced with plasmid DNA containing the HBV genome develop viremia and early portal liver fibrosis, which is also characteristic of the disease in humans. At the same time, serum transaminase levels in infected macaques remain within the physiologic normal range [101]. In rhesus macaques expressing hNTCP in hepatocytes, moderate transient viremia can also be established [47].

Primate models, which are extremely important in the study of HBV, are not widely used not only for ethical reasons, but also because of their high cost and the lack of necessary materials (reagents) for such studies.

Models of socially significant HBV co-infections

HBV infection is a socially determined chronic disease and can be mixed with other infections caused by hepatitis C (HCV) and D (HDV) viruses, human immunodeficiency virus (HIV) or tuberculosis. The pathophysiologic, immunologic, and pathomorphological features of these co-infections differ significantly from those of mono-infection. Therefore, when devel-

oping therapeutic approaches, it is advisable to develop animal models that can reflect the properties of co-infections.

HBV/HCV and HBV/HDV coinfections

Hepatitis C is widespread. The WHO estimates that about 3% of the world's population is infected with HCV, with about 1.5 million new infections occurring each year. More than 250,000 people die each year from the hepatitis C sequelae (mainly cirrhosis and liver cancer).

Hepatitis D is an inflammatory liver disease caused by hepatitis D virus (HDV). HDV requires the presence of HBV for its reproduction (without HBV, even hepatitis D infection is not possible). HBV/HDV co-infection is considered the most severe form of chronic hepatitis due to the more rapid development of HCC, which is fatal.

Due to their ability to control hepatocyte apoptosis, transgenic humanized hu-uPA/SCID/beige and AFC8-hu-HSC/Hep mice can be used to mimic HBV/HCV or HBV/HDV co-infections. Virus titers in these models reach detectable serum levels 3 weeks after HBV/HDV infection. HBV viremia is slightly lower than HDV viremia because HBV/HDV co-infection is associated with induction of human type I interferon expression, in contrast to HBV mono-infection [102]. FRG and Alb-uPA mice have also been successfully used for xenotransplantation of human hepatocytes and subsequent HCV infection. Interestingly, the transmissible nature of the disease was confirmed in the course of these studies [103, 104].

Y. Amako et al. demonstrated the possibility of the infection of naive animals with serum of seropositive tupaia with subsequent development of acute hepatitis and viremia. Infection of tupaia with serum of HCV-positive humans resulted in a 2-5-fold increase in serum alanine aminotransferase level and prolonged transient viremia. At the same time, hepatolipidosis was observed in infected animals. During the next 2 years, lymphocytic infiltrates characteristic of chronic pathology was formed around the portal areas and liver sinusoids. And in the next year, the inflammation led to the development of moderate and even severe fibrosis with elements of liver cirrhosis [105].

As with HBV, the functional receptor for HDV is NTCP. At the same time, HDV requires HBV envelope proteins for release from infected hepatocytes and continuation of the infectious process [106], although it is known that HDV can persist in resting (non-dividing) woodchuck hepatocytes for at least 42 days, independently of HBV [103]. *In vivo* studies performed on woodchucks infected with both WHV and HDV have helped in the development of immunization strategies. However, J.L. Gerin claimed that one of the obstacles to the multilateral use of this model was the early development of WHV-induced HCC [107].

HBV/HIV co-infection

At the end of 2022, 33.1–45.7 million people worldwide are infected with HIV, according to various estimates. About 1% of people living with HBV infection (2.7 million people) are also infected with HIV. HIV-positive patients with HBV are known to have an 8-fold higher risk of liver-associated mortality due to the use of highly active antiretroviral therapy. Furthermore, HIV infection accelerates the progression of HBV infection, significantly increasing the risk of liver cirrhosis or HCC. However, HBV infection does not lead to an accelerated reduction in the amount of CD4⁺ T-cells [108].

Given the similar transmission routes and risk factors, cases of HBV/HIV co-infection are not uncommon. Therefore, double-humanized mouse models are used to study HBV/HIV co-infection. Such a model would be AFC8-hu-HSC/Hep mice. AFC8-hu-HSC/Hep mice are characterized by inducible hepatocyte apoptosis due to a transgene incorporated the genome (AFC8 — FK506-binding protein and caspase 8 under the control of the albumin promoter). Infection of these mice with HBV leads to the expression of human fibrogenic proteins that cause the development of liver inflammation and fibrosis correlating with the activation of hepatic stellate cells in the humanized region of the liver [109]. Humanized models of HIS/hu-HEP [91] or TK-NOG-hu-HSC/Hep [110] mice can be used in a similar manner. However, the main obstacle to the development of these models is the necessity to use tissues obtained from a single donor.

The mouse model of HIL, obtained by transplantation of embryonic hCD34⁺ cells into the liver parenchyma of immunodeficient mice, is more simple to use. With this method, it is possible to obtain mice with double humanization and minimized risk of graft-versus-host reaction. After infection, HIL mice exhibited nodular liver fibrosis progressing to diffuse fibrosis with multiple septa. The diffuse fibrosis led to the development of severe scarring and nodular cirrhosis as a result of inflammation and activation of hepatic stellate cells. At the same time, a threefold increase in the number of hCD45⁺ cells and improved regulation of both human and murine fibrogenic genes were observed in the liver parenchyma of animals [111].

HBV/Mycobacterium tuberculosis co-infection

Tuberculosis, like infections caused by HCV, HDV and HIV, is a socially significant disease. In 2021, an estimated 10.6 million people worldwide had tuberculosis. Co-infections of HBV and *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) are not uncommon.

It is a known fact that antitubercular drugs are primarily used in the therapy of HBV and MTB co-infection, which against the background of hepatic tuberculosis can carry a huge risk of liver damage [112]. Rhesus macaques and cynomolgus monkeys are susceptible

to MTB infection by the natural route of infection, and they develop granulomas, including in the liver, with a highly ordered architecture with central necrosis surrounded by a peripheral rim [113].

The development of an aerosolized method of infection mice made it possible to increase the virulence of mycobacteria relative to the intravenous method [114]. The BLT model obtained by transplantation of fetal tissues of human bone marrow, liver and thymus under the kidney capsule of immunodeficient mice is susceptible to infection with mycobacteria. 3-4 weeks after MTB inoculation, multifocal inflammation of liver parenchyma developed. The bacteria were localized in the areas of inflammation, but no ductal obstruction was observed in the liver 4 weeks after infection [115]. The main difficulty of the BLT model lies in the xenotransplantation procedure, which requires manipulations with extreme precision. Furthermore, in the BLT model, the developing human liver tissue does not constitute the full structure of the organ.

Highly immunodeficient TK-NOG mice, suitable for xenotransplantation of both liver tissue and hematopoietic stem cells, may become a universal model for some infections. Their humanization may make it possible to mimic not only HBV infection combined with HIV [110], but also make these mice a promising model for future studies of HBV/MTB co-infection.

L. Zhan et al. reported the susceptibility of tupaia to experimental intravenous infection with high and low doses of MTB. Given that tupaia are outbred, the observed clinical signs of disease varied among animals even within the same experimental group. Pathomorphological examination showed the presence of tuberculous granulomas in the lungs and spleen with central caseous necrosis and a large number of inflammatory cells in the periphery. Focal necrosis with inflammatory cells was common in the adrenal cortex and capsule and cerebellum. Infiltrated with inflammatory cells, MTB-containing lesion foci were found in the liver, kidney and extensive necrotic foci in muscle. It is important to note that animals reached humane endpoints by week 11 [116]. Taking all of this into account, tupaia can also be considered a promising model for future HBV/MTB co-infection studies.

Conclusion

DHBV is only 40% homologous to HBV [26] and uses carboxypeptidase D as an entry receptor [27]. Therefore, ducks have low relevance as models for evaluating the efficacy of antiviral therapy [117]. Similar to ducks, woodchucks, bats, and primates are not inbred, and immunologic reagents for comprehensive

studies of hepadnavirus infections are not available. Furthermore, many natural models of infection are simply endangered.

Mice with immunotolerance can only maintain HBV replication in the context of mouse morphologic and physiologic features. In this case, the life cycle of the virus is incomplete due to the absence of the stages of virus entry, cccDNA formation and infection dissemination. The relevance of the results obtained on chimeric mice possessing a humanized liver cannot be translated to humans due to their immunodeficiency and, consequently, the absence of pathomorphological changes caused by the immune response against infected cells.

Tupaia can be infected with HBV, but they are also outbred and their use *in vivo* as models requires preliminary studies. Double-humanized mice represent a promising area for further research. However, the stability of viremia is directly dependent on the degree of humanization of mouse liver with administered human hepatocytes [102]. Furthermore, transplantation (engraftment) of xenogeneic immune system and liver induces mismatches in the major histocompatibility complex system, which leaves open the question of the relevance of recognition mechanisms and immune responses against the virus in such models.

Given the inaccessibility of chimpanzees for HBV research, as well as the similarity of the immune system and the relative availability of some reagents, non-human primates possibly provide the most reliable immune data for translational research [46]. However, these results need to be carefully interpreted by cross-checking in other biological systems.

A new trend is the development of animal models of HBV-associated socially significant infections. Immunodeficiency of some models would possibly become their advantage, as in the case of simulated HBV/HIV co-infection. On the other hand, simultaneous infection with two pathogens carries the risk of a significant reduction in the quality of life of the animal. Therefore, the design of such studies should be reviewed by ethical committees in the strictest manner.

During the study of a pathogen such as HBV, there are no models that are of no practical value. In conclusion, models that can demonstrate both the long-term development of hepatopathy and the immunologic features of the infection process *in vivo* will become more widespread in future studies of both hepatotropic viruses and co-infections. Furthermore, the identification of novel natural reservoirs of hepadnavirus infections for the purpose of expanding the selection of available models will shed light on the origin and evolution of HBV.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Miller R.H., Kaneko S., Chung C.T., et al. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. 1989;9(2):322–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.1840090226>
- Song H., Xu F., Xiao Q., Tan G. Hepatitis B virus X protein and its host partners. *Cell. Mol. Immunol.* 2021;18(5):1345–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00674-z>
- Seeger C., Mason W.S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64(1):51–68. DOI: <https://doi.org/10.1128/mubr.64.1.51-68.2000>
- Summers J., Mason W.S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*. 1982;29(2):403–15. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90157-x)
- Gerlich W.H. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin. Infect. Dis.* 2007;44(9):1170–2. DOI: <https://doi.org/10.1086/513296>
- Tupoleva T.A., Ignatova E.N., Gulyaeva A.A., et al. The screening of donor blood on antibodies to nuclear antigen of hepatitis B virus as a tool of increasing of safety of transfusion for patients with diseases of blood system. *Klin. Lab. Diagn.* 2016;61(5):311–6. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-5-311-316>
- Aguilar J.C., Lobaina Y., Muzio V., et al. Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen. *Immunol. Cell Biol.* 2004;82(5):539–46. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01278.x>
- Bouchard M.J., Schneider R.J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* 2004;78(23):12725–34. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.23.12725-12734.2004>
- Syed G.H., Wyles D.L., Siddiqui A. Hepatitis viruses. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier;2014.
- Warner N., Locarnini S. Replication of hepatitis B virus. In: *Zakim and Boyer's Hepatology*. Elsevier;2012:86–96.
- Yan H., Peng B., Liu Y., et al. Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J. Virol.* 2014;88(6):3273–84. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.03478-13>
- Schieck A., Schulze A., Gähler C., et al. Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology*. 2013;58(1):43–53. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.26211>
- Lempp F.A., Wiedtke E., Qu B., et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes. *Hepatology*. 2017;66(3):703–16. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.29112>
- Mason W.S., Seal G., Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 1980;36(3):829–36. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.36.3.829-836.1980>
- Tavis J.E., Massey B., Gong Y. The duck hepatitis B virus polymerase is activated by its RNA packaging signal, epsilon. *J. Virol.* 1998;72(7):5789–96. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.72.7.5789-5796.1998>
- Tavis J.E., Ganem D. Evidence for activation of the hepatitis B virus polymerase by binding of its RNA template. *J. Virol.* 1996;70(9):5741–50. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.5741-5750.1996>
- Beck J. dNTP versus NTP discrimination by phenylalanine 451 in duck hepatitis B virus P protein indicates a common structure of the dNTP-binding pocket with other reverse transcriptases. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(7):1679–87. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1679>
- Junker-Niepmann M., Bartenschlager R., Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 1990;9(10):3389–96. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07540.x>
- Tavis J.E., Ganem D. RNA sequences controlling the initiation and transfer of duck hepatitis B virus minus-strand DNA. *J. Virol.* 1995;69(7):4283–91. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.69.7.4283-4291.1995>
- Tuttleman J.S., Pourcel C., Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. 1986;47(3):451–60. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90602-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90602-1)
- Wu T.T., Coates L., Aldrics C.E., et al. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology*. 1990;175(1):255–61. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90206-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90206-7)
- Summers J., Smith P.M., Horwich A.L. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J. Virol.* 1990;64(6):2819–24. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.64.6.2819-2824.1990>
- Foster W.K., Miller D.S., Scougall C.A., et al. Effect of antiviral treatment with Entecavir on age- and dose-related outcomes of duck hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 2005;79(9):5819–32. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.79.9.5819-5832.2005>
- Colledge D., Civitico G., Locarnini S., Shaw T. In vitro anti-hepadnaviral activities of combinations of Penciclovir, lamivudine, and adefovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(3):551–60. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.44.3.551-560.2000>
- Campagna M.R., Liu F., Mao R., et al. Sulfamoylbenzamide derivatives inhibit the assembly of hepatitis B virus nucleocapsids. *J. Virol.* 2013;87(12):6931–42. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00582-13>
- Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* 2007;13(1):14. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.14>
- Tong S., Li J., Wands J.R. Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor. *J. Virol.* 1999;73(10):8696–702. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.73.10.8696-8702.1999>
- Lanford R.E., Chavez D., Barrera A., Brasky K.M. An infectious clone of woolly monkey hepatitis B virus. *J. Virol.* 2003;77(14):7814–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.77.14.7814-7819.2003>
- Mason W.S., Cullen J., Saputelli J., et al. Characterization of the antiviral effects of 2' carbodideoxyguanosine in ducks chronically infected with duck hepatitis B virus. *Hepatology*. 1994;19(2):398–411. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.1840190219>
- Summers J., Smolec J.M., Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1978;75(9):4533–7. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4533>
- Mulrooney-Cousins P.M., Michalak T.I. Asymptomatic hepadnaviral persistence and its consequences in the woodchuck model of occult hepatitis B virus infection. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2015;3(3):211–9. DOI: <https://doi.org/10.14218/jcth.2015.00020>
- Menne S., Tumas D.B., Liu K.H., et al. Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* 2015;62(6):1237–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.026>
- Cheng H.R., Kao J.H., Wu H.L., et al. Clinical and virological features of occult hepatitis B in patients with HBsAg seroclearance post-treatment or spontaneously. *Liver. Int.* 2014;34(6):e71–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/liv.12324>
- Liu Y., Wang B., Wang L., et al. Transcriptome analysis and comparison of *Marmota monax* and *Marmota himalayana*.

- PLoS One*. 2016;11(11):e0165875.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165875>
35. Zhou T., Saputelli J., Aldrich C.E., et al. Emergence of drug-resistant populations of woodchuck hepatitis virus in woodchucks treated with the antiviral nucleoside lamivudine. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1999;43(8):1947–54.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.43.8.1947>
36. Colonna R.J., Genovesi E.V., Medina I., et al. Long-term entecavir treatment results in sustained antiviral efficacy and prolonged life span in the woodchuck model of chronic hepatitis infection. *J. Infect. Dis.* 2001;184(10):1236–45.
DOI: <https://doi.org/10.1086/324003>
37. Fairman J., Liu K.H., Menne S. Prevention of liver tumor formation in woodchucks with established hepatocellular carcinoma by treatment with cationic liposome-DNA complexes. *BMC Cancer*. 2017;17(1):172.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3163-2>
38. Wang B., Zhu Z., Zhu B., et al. Nucleoside analogues alone or combined with vaccination prevent hepadnavirus viremia and induce protective immunity: Alternative strategy for hepatitis B virus post-exposure prophylaxis. *Antiviral. Res.* 2014;105:118–25.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.02.016>
39. Li X., Zhang J., Yang Z., et al. The function of targeted host genes determines the oncogenicity of HBV integration in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2014;60(5):975–84.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.014>
40. He B., Li Z., Yang F., et al. Virome profiling of bats from Myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel mammalian viruses. *PLoS One*. 2013;8(4):e61950.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061950>
41. Drexler J.F., Geipel A., König A., et al. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013;110(40):16151–6.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1308049110>
42. Lanford R.E., Chavez D., Brasky K.M., et al. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998;95(10):5757–61.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5757>
43. Ange-van Heugten K.D., Burns R., Verstegen M.W.A., et al. Evaluation of diabetes determinants in woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*. 2007;91(11-12):481–91.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00679.x>
44. Hagell S., Whipple A.V., Chambers C.L. Population genetic patterns among social groups of the endangered Central American spider monkey (*Ateles geoffroyi*) in a human-dominated landscape. *Ecol. Evol.* 2013;3(5):1388–99.
DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.547>
45. Chen C.Y., Winer B.Y., Chavez D., et al. Woolly monkey-HBV infection in squirrel monkeys as a surrogate non-human primate model of HBV infection. *Hepatol. Commun.* 2020;4(3):371–86.
DOI: <https://doi.org/10.1002/hep4.1471>
46. Dupinay T., Gheit T., Roques P., et al. Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among *Macaca fascicularis* from Mauritius island: *Hepatology*. 2013;58(5):1610–20.
DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.26428>
47. Burwitz B.J., Wettengel J.M., Mück-Häusl M.A., et al. Hepatocytic expression of human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide enables hepatitis B virus infection of macaques. *Nat. Commun.* 2017;8(1):2146.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01953-y>
48. Takeuchi J.S., Fukano K., Iwamoto M., et al. A single adaptive mutation in sodium taurocholate cotransporting polypeptide induced by hepadnaviruses determines virus species specificity. *J. Virol.* 2019;93(5):e01432-18.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01432-18>
49. Chisari F.V., Pinkert C.A., Milich D.R., et al. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science*. 1985;230(4730):1157–60.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.3865369>
50. Milich D.R., Jones J.E., Hughes J.L., et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1990;87(17):6599–603.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6599>
51. Kim C.M., Koike K., Saito I., et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*. 1991;351(6324):317–20. DOI: <https://doi.org/10.1038/351317a0>
52. Winer B.Y., Shirvani-Dastgerdi E., Bram Y., et al. Preclinical assessment of antiviral combination therapy in a genetically humanized mouse model for hepatitis delta virus infection. *Sci. Transl. Med.* 2018;10(447):eaap9328.
DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap9328>
53. Guidotti L.G., Matzke B., Schaller H., Chisari F.V. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 1995;69(10):6158–69.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.6158-6169.1995>
54. Wang Y., Chen K., Wu Z., et al. Immunizations with hepatitis B viral antigens and a TLR7/8 agonist adjuvant induce antigen-specific immune responses in HBV-transgenic mice. *Int. J. Infect. Dis.* 2014;29:31–6.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.07.015>
55. Moriyama T., Guilhot S., Klopchin K., et al. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science*. 1990;248(4953):361–4.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1691527>
56. Chisari F.V., Filippi P., McLachlan A., et al. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J. Virol.* 1986;60(3):880–7.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.60.3.880-887.1986>
57. Tian Y., Kuo C.F., Akbari O., Ou J.H.J. Maternal-derived hepatitis B virus e antigen alters macrophage function in offspring to drive viral persistence after vertical transmission. *Immunity*. 2016;44(5):1204–14.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.008>
58. Zhu H., Wang Y., Chen J., et al. Transgenic mice expressing hepatitis B virus X protein are more susceptible to carcinogen induced hepatocarcinogenesis. *Exp. Mol. Pathol.* 2004;76(1):44–50.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2003.09.001>
59. McCaffrey A.P., Nakai H., Pandey K., et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2003;21(6):639–44. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt824>
60. Julander J.G., Colonna R.J., Sidwell R.W., Morrey J.D. Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antiviral. Res.* 2003;59(3):155–61.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(03\)00109-8](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(03)00109-8)
61. Hong M., Bertolotti A. Tolerance and immunity to pathogens in early life: insights from HBV infection. *Semin. Immunopathol.* 2017;39(6):643–52.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0641-1>
62. Wieland S.F., Guidotti L.G., Chisari F.V. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Virol.* 2000;74(9):4165–73.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.9.4165-4173.2000>
63. Guidotti L.G., Ishikawa T., Hobbs M.V., et al. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1996;4(1):25–36.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80295-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80295-2)
64. Baron J.L., Gardiner L., Nishimura S., et al. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model

- of hepatitis B virus infection. *Immunity*. 2002;16(4):583–94. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00305-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00305-9)
65. Publicover J., Goodsell A., Nishimura S., et al. IL-21 is pivotal in determining age-dependent effectiveness of immune responses in a mouse model of human hepatitis B. *J. Clin. Invest.* 2011;121(3):1154–62. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci44198>
 66. Yang P.L., Althage A., Chung J., et al. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010;107(2):798–802. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913498107>
 67. Huang L.R., Gäbel Y.A., Graf S., et al. Transfer of HBV genomes using low doses of Adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1447–50.e3. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.006>
 68. John von Freyend M., Untergasser A., Arzberger S., et al. Sequential control of hepatitis B virus in a mouse model of acute, self-resolving hepatitis B: Control of HBV infection in mice. *J. Viral. Hepat.* 2011;18(3):216–26. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01302.x>
 69. Yang D., Liu L., Zhu D., et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* 2014;11(1):71–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.43>
 70. Yang P.L., Althage A., Chung J., Chisari F.V. Hydrodynamic injection of viral DNA: A mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002;99(21):13825–30. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.202398599>
 71. Huang L.R., Wu H.L., Chen P.J., Chen D.S. An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006;103(47):17862–7. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0608578103>
 72. Li G., Zhu Y., Shao D., et al. Recombinant covalently closed circular DNA of hepatitis B virus induces long-term viral persistence with chronic hepatitis in a mouse model. *Hepatology*. 2018;67(1):56–70. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.29406>
 73. Wu M., Wang C., Shi B., et al. A novel recombinant cccDNA-based mouse model with long term maintenance of reccDNA and antigenemia. *Antiviral. Res.* 2020;180:104826. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104826>
 74. Ye L., Yu H., Li C., et al. Adeno-associated virus vector mediated delivery of the HBV genome induces chronic hepatitis B virus infection and liver fibrosis in mice. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130052. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130052>
 75. Vuyyuru R., Herzog-Hauff S., Tavakoli S., et al. Vaccination with dendritic cells induces strong HBV specific Th cell and CTL responses in HBV trimera mice. *Z. Gastroenterol.* 2007;45(01):A4_24. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2007-967882>
 76. Schinazi R.F., Bassit L., Clayton M.M., et al. Evaluation of single and combination therapies with tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine *in vitro* and in a robust mouse model supporting high levels of hepatitis B virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(12):6186–91. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01483-12>
 77. Tsuge M., Hiraga N., Takaishi H., et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology*. 2005;42(5):1046–54. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.20892>
 78. Meuleman P., Libbrecht L., De Vos R., et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology*. 2005;41(4):847–56. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.20657>
 79. Meuleman P., Lerouxroels G. The human liver-uPA-SCID mouse: A model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral. Res.* 2008;80(3):231–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.07.006>
 80. Dalton G., Oh S.H., Premont R., et al. Hedgehog signaling directly regulates metabolism and proliferation in hepatocytes and is critical for normal liver regeneration following partial hepatectomy in mice. *Gastroenterology*. 2018;154(6):S-166. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(18\)30966-1](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(18)30966-1)
 81. Bissig K.D., Wieland S.F., Tran P., et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J. Clin. Invest.* 2010;120(3):924–30. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci40094>
 82. Long K.R., Lomonosova E., Li Q., et al. Efficacy of hepatitis B virus ribonuclease H inhibitors, a new class of replication antagonists, in FRG human liver chimeric mice. *Antiviral. Res.* 2018;149:41–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.008>
 83. Ruan P., Yang C., Su J., et al. Histopathological changes in the liver of tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) persistently infected with hepatitis B virus. *Virology*. 2013;10(1):333. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-333>
 84. Fan Y., Huang Z.Y., Cao C.C., et al. Genome of the Chinese tree shrew. *Nat. Commun.* 2013;4(1):1426. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms2416>
 85. Walter E., Keist R., Niederöst B., et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*: Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*. 1996;24(1):1–5. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.510240101>
 86. Winer B.Y., Ding Q., Gaska J.M., Ploss A. In vivo models of hepatitis B and C virus infection. *FEBS Lett.* 2016;590(13):1987–99. DOI: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12157>
 87. Yan H., Zhong G., Xu G., et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*. 2012;1:e00049. DOI: <https://doi.org/10.7554/elife.00049>
 88. Köck J., Nassal M., MacNelly S., et al. Efficient infection of primary Tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J. Virol.* 2001;75(11):5084–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.75.11.5084-5089.2001>
 89. Yang C., Ruan P., Ou C., et al. Chronic hepatitis B virus infection and occurrence of hepatocellular carcinoma in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). *Virology*. 2015;12(1):26. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0256-x>
 90. Bility M.T., Cheng L., Zhang Z., et al. Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: Induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages. *PLoS Pathog.* 2014;10(3):e1004032. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004032>
 91. Dusséaux M., Masse-Ranson G., Darce S., et al. Viral load affects the immune response to HBV in mice with humanized immune system and liver. *Gastroenterology*. 2017;153(6):1647–61.e9. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.034>
 92. Yuan L., Jiang J., Liu X., et al. HBV infection-induced liver cirrhosis development in dual-humanised mice with human bone mesenchymal stem cell transplantation. *Gut*. 2019;68(11):2044–56. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316091>
 93. Asabe S., Wieland S.F., Chattopadhyay P.K., et al. The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 2009;83(19):9652–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00867-09>
 94. Wieland S.F. The chimpanzee model for hepatitis B virus infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015;5(6):a021469. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021469>
 95. Gerety R.J., Tabor E., Purcell R.H., Tyeryar F.J. Summary of an international workshop on hepatitis B vaccines. *J. Infect. Dis.* 1979;140(4):642–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/140.4.642>

ОБЗОРЫ

96. Payette P.J., Ma X., Weeratna R.D., et al. Testing of CpG-optimized protein and DNA vaccines against the hepatitis B virus in chimpanzees for immunogenicity and protection from challenge. *Intervirology*. 2006;49(3):144–51. DOI: <https://doi.org/10.1159/000089375>
97. Shata M.T.M., Pfahler W., Brotman B., et al. Attempted therapeutic immunization in a chimpanzee chronic HBV carrier with a high viral load. *J. Med. Primatol.* 2006;35(3):165–71. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2006.00152.x>
98. Kamili S., Sozzi V., Thompson G., et al. Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model. *Hepatology*. 2009;49(5):1483–91. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.22796>
99. Guidotti L.G., Rochford R., Chung J., et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*. 1999;284(5415):825–9. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.825>
100. Lanford R.E., Guerra B., Chavez D., et al. GS-9620, an oral agonist of toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1508–17. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.003>
101. Gheit T., Sekkat S., Cova L., et al. Experimental transfection of *Macaca sylvanus* with cloned human hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 2002;83(7):1645–9. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-7-1645>
102. Tham C.Y.L., Kah J., Tan A.T., et al. Hepatitis delta virus acts as an immunogenic adjuvant in hepatitis B virus-infected hepatocytes. *Cell Rep. Med.* 2020;1(4):100060. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100060>
103. Netter H.J., Gerin J.L., Tennant B.C., Taylor J.M. Apparent helper-independent infection of woodchucks by hepatitis delta virus and subsequent rescue with woodchuck hepatitis virus. *J. Virol.* 1994;68(9):5344–50. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.68.9.5344-5350.1994>
104. Mercer D.F., Schiller D.E., Elliott J.F., et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* 2001;7(8):927–33. DOI: <https://doi.org/10.1038/90968>
105. Amako Y., Tsukiyama-Kohara K., Katsume A., et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virol.* 2010;84(1):303–11. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01448-09>
106. Sureau C. The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006;307:113–31. DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-29802-9_6
107. Gerin J.L. Animal models of hepatitis delta virus infection and disease. *ILAR J.* 2001;42(2):103–6. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.42.2.103>
108. Porras-Ramírez A., Rico-Mendoza A. Coinfection of hepatitis B and C in HIV patients: a review of the state of the art. In: *Hepatitis B and C*. IntechOpen;2020. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.83704>
109. Washburn M.L., Bility M.T., Zhang L., et al. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1334–44. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.001>
110. Dagur R.S., Wang W., Makarov E., et al. Establishment of the dual humanized TK-NOG mouse model for HIV-associated liver pathogenesis. *J. Vis. Exp.* 2019;(151):10.3791/58645. DOI: <https://doi.org/10.3791/58645>
111. Keng C.T., Sze C.W., Zheng D., et al. Characterisation of liver pathogenesis, human immune responses and drug testing in a humanised mouse model of HCV infection. *Gut*. 2016;65(10):1744–53. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307856>
112. Arora U., Garg P., Agarwal S., et al. Complexities in the treatment of coinfection with HIV, hepatitis B, hepatitis C, and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 2021;21(12):e399–406. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30765-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30765-9)
113. Mehra S., Alvarez X., Didier P.J., et al. Granuloma correlates of protection against tuberculosis and mechanisms of immune modulation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 2013;207(7):1115–27. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis778>
114. North R.J. *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. *J. Infect. Dis.* 1995;172(6):1550–3. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1550>
115. Calderon V.E., Valbuena G., Goez Y., et al. A humanized mouse model of tuberculosis. *PLoS One*. 2013;8(5):e63331. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063331>
116. Zhan L., Ding H., Lin S., et al. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection in the Chinese tree shrew. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014;360(1):23–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12524>
117. Quinet J., Jamard C., Burtin M., et al. Nucleic acid polymer REP 2139 and nucleos(T)ide analogues act synergistically against chronic hepadnaviral infection *in vivo* in Pekin ducks. *Hepatology*. 2018;67(6):2127–40. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.29737>

Информация об авторах

Нагорных Алексей Михайлович[✉] — к.вет.н., с.н.с. научной группы разработки экспериментальных моделей лаборатории экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, nagornih@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-8320-2999>

Тюменцева Марина Алексеевна — к.б.н., зав. лабораторией генетического редактирования отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Тюменцев Александр Игоревич — к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

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

Участие авторов. Нагорных А.М., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И. — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, концепция и дизайн исследования; Акимкин В.Г. — концепция и дизайн исследования, редактирование. 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 25.09.2023;
принята к публикации 13.11.2023;
опубликована 28.11.2023

Information about the authors

Aleksey M. Nagornykh[✉] — Cand. Sci. (Vet.), senior researcher, Scientific group of experimental models' development, Laboratory of experimental pharmacology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, nagornih@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-8320-2999>

Marina A. Tyumentseva — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of genome editing, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Aleksandr I. Tyumentsev — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental pharmacology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

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

Author contribution. Nagornykh A.M., Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I. — collection and processing of material, statistical processing, writing the text, concept and design of the study; Akimkin V.G. — concept and design of the study, editing. 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 25.09.2023;
accepted for publication 13.11.2023;
published 28.11.2023

ХРОНИКА

Итоги X Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов»



20–22 сентября 2023 г. в Оренбурге состоялась юбилейная X Российская научная конференция с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов», посвящённая 300-летию Российской академии наук и 10-летию науки и технологий. Конференция проходила на базе трех научных учреждений: Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН — обособленного структурного подразделения Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава России, Федерального научного центра биологических систем и агротехнологий РАН. Конференция поддержана Уральским отделением РАН, Отделением физиологических наук РАН, Отделением медицинских наук РАН, Правительством Оренбургской области, Всероссийским научно-практическим обществом эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Межрегиональным микробиологическим обществом. В работе конференции приняли участие более 120 сотрудников из 39 ведущих научных учреждений, вузов и медицинских организаций России (Москва, Санкт-Петербург, Иркутск, Екатеринбург, Челябинск, Тверь, Тюмень, Пушино, Казань, Оренбург, Уфа, Пермь, Сургут, Самара, Ярославль) и Казахстана (Уральск).

Заслушаны 12 пленарных и 68 секционных докладов, представлены 26 стендовых сообщений по направлениям:

- Симбионтная микробиота и её роль в обеспечении физиологических функций хозяина.
- Иммунологические аспекты персистирующих инфекций и взаимоотношений в системе «патоген–хозяин–микробиом».
- Современные подходы к диагностике, профилактике и лечению заболеваний микробной этиологии.
- Микробиологические и иммунологические аспекты развития эндогенных бактериальных инфекций.
- Микробные сообщества природных экосистем, био- и агросистем. Микробные технологии.

- Симбионтная микробиота как объект исследований в животноводстве.

Тематика конференции является весьма актуальной, т.к. микробные сообщества присутствуют в различных природных экосистемах и играют важную физиологическую и патологическую роль в организмах многоклеточных (человек, животные, растения) и даже одноклеточных (протисты). В современной медицине, биотехнологиях и агротехнологиях исследования микробиоты человека, животных и растений находятся на переднем крае науки. Персистентный потенциал служит основой для долгосрочного выживания микроорганизмов в организме и природных экосистемах и играет ключевую роль в формировании симбиотических связей.

Пленарная сессия была посвящена фундаментальным проблемам персистенции и симбиотических взаимодействий микроорганизмов, а также практическим аспектам исследований микробиоты в медицине, биотехнологиях и агротехнологиях. С пленарными докладами выступили ведущие российские ученые: академик РАН О.В. Бухарин, член-корр. РАН С.В. Черкасов (ИКВС УрО РАН, Оренбург); академик В.В. Зверев (НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва); д.б.н. С.А. Ермолаева (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва); д.м.н., проф. И.Г. Козлов (НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева, Москва); д.б.н. М.В. Донова, д.б.н. В.А. Щербакова (ИБХМ РАН, Пушино); д.б.н. Ю.В. Гоголев (КИББ КНЦ РАН, Казань); д.м.н., проф. В.К. Ильин (ГНЦ ИМБП РАН, Москва).

На конференции обсуждались проблемы выживания микроорганизмов и их длительного существования в биологических объектах и окружающей среде; формирование симбиотических систем и различных форм симбиоза; взаимоотношения микробиоты и биохимических параметров организма человека; влияние лактоферрина на стабильность биоценоза в условиях космического полёта; иммунорегуляторные механизмы поддержания гомеостаза микробиоты; вакцинация против респираторных патогенов и разработка вакцин для борьбы с опухолями; иммуномодулирующее действие бактериальных лигандов при бронхообструктивных забо-

леваниях; иммунобиологические эффекты синтетического аналога гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и перспективы его использования в клинической практике.

Активно обсуждались проблемы развития послеоперационных воспалительных и внутригоспитальных осложнений; молекулярные механизмы развития эндогенных бактериальных инфекций; вновь была поднята тема острой проблемы растущей микробной устойчивости к антибиотикам. В центре внимания оказались вопросы улучшения диагностики и лечения хронической инфекции лёгких (ХИЛ) у больных с муковисцидозом, а также профилактические меры по ограничению распространения мультирезистентных штаммов возбудителей ХИЛ.

На секции «Микробиота на стыке науки и практики» учёные познакомили врачей с новейшими фундаментальными разработками и возможностями их внедрения в практическое здравоохранение. Обнаружение новых микроорганизмов, продуктов их жизнедеятельности, генов и функций, а также изучение механизмов симбиоза между человеком и микробами способствуют широкому использованию микробных технологий в прикладных аспектах, в том числе в получении метаболитов бактерий, являющихся потенциальными антибиотиками.

Широкий спектр докладов заслушан по микробным сообществам природных экосистем и биотехнологии. Представлены доклады по микробиому растений и использованию штаммов *Bacillus* spp. в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных растений. Активно обсуждались микробиомы галофильных микроводорослей; молекулярно-генетические механизмы симбиоза бактерий и вирусов с простейшими; оценка качества подготовки питье-

вой воды; регуляция Quorum sensing — зависимых процессов у грамотрицательных бактерий.

В рамках конференции организован симпозиум для практикующих врачей «Микробиота на стыке науки и практики», посвящённый вопросам оценки и коррекции микробиома человека. Участие специалистов мирового уровня позволило данному мероприятию стать важным шагом в реализации проекта по превентивной медицине, площадкой для которого является Оренбургская область.

Активное научное взаимодействие происходило и на стендовой сессии, во время которой представлены доклады молодых исследователей. В заключение конференции проведён круглый стол «Персистенция и симбиоз микроорганизмов: медицинские, экологические и биотехнологические аспекты». Труды участников конференции опубликованы в электронном журнале «Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН» № 2, 3 за 2023 г.

По итогам конференции принято решение:

1. Рекомендовать изучение проблемы персистенции микроорганизмов как способа поддержания симбиотических систем между прокариотами и эукариотами для решения актуальных научных вопросов в области микробиологии, экологии, медицины и биотехнологии.

2. Привлекать специалистов в смежных с микробиологией областях (генетиков, биоинформатиков, биотехнологов, иммунологов) для регулярного обсуждения различных сторон проблем персистенции и симбиоза микроорганизмов с целью обмена научными знаниями и координации текущих исследований.

3. Провести следующую конференцию «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» в Оренбурге в 2026 г.

Черкасов С.В., Плотников А.О.,
Селиванова Е.А., Шуплова Е.А.