

1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

Том 101
2024

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ
МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

1

JANUARY — FEBRUARY

VOLUME 101
2024

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.

1

ЯНВАРЬ – ФЕВРАЛЬ

**ТОМ 101
2024**

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
<http://npromp.ru>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

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

Начальник редакционно-

издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

111123, Москва, ул. Новогиреевская, 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 29.02.2024.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 19,5.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместители главного редактора

Семенов Т.А., д.м.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия
Макарова М.А., д.м.н., Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Ответственные секретари

Платонов А.Е., д.м.н., проф., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Мионов К.О., д.м.н., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., академик РАН, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Брико Н.И., д.м.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Брусина Е.Б., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Бухарин О.В., д.м.н., проф., академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Гинцбург А.Л., д.б.н., проф., академик РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Горелов А.В., д.м.н., проф., академик РАН, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Жирнов О.П., д.б.н., проф., член-корр. РАН, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Караулов А.В., д.м.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Козлов Р.С., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия

Куличенко А.Н., д.м.н., проф., академик РАН, Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Кутырев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Иностранные члены редакционной коллегии

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

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

Michael O. Favorov, PhD, D.Sci. (Medicine), 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, European Academy of Natural Sciences, R. Koch Medical Society (Germany), German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Дьяков И.Н., к.б.н., Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Кюрегян К.К., д.б.н., проф., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., академик РАН, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия

Лукашев А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Малеев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Михайлов М.И., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; Белгородский государственный университет, Белгород, Россия

Несвижский Ю.В., д.м.н., проф., Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Онищенко Г.Г., д.м.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Свитич О.А., д.м.н., член-корр. РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Тартаковский И.С., д.б.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Тотолян А.А., д.м.н., проф., академик РАН, Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Черкасов С.В., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, 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., Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

Никонова А.А., к.б.н., Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2024

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.

1

JANUARY–FEBRUARY

VOLUME 101

2024

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 Common 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
www.crie.ru;

Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists
<http://npomp.ru>

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: jmei@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 February 29, 2024.

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

Deputy Editors

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

Maria A. Makarova, Dr. Sci. (Medicine), Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Executive Secretaries

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

Nikolay I. Briko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Ural Branch of the Academy of Sciences, Orenburg, Russia

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

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

Oleg P. Zhirnov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Belgorod State University, Belgorod, Russia

Gennadiy G. Onishchenko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Yury V. Nesvizhsky, Professor, Dr. Sci. (Med.), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

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

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

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

Foreign members of the Editorial Board

Alexander V. Bocharov, MD, PhD (Medicine), Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, USA

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

Michael O. Favorov, PhD, D.Sci. (Medicine), 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, European Academy of Natural Sciences, R. Koch Medical Society (Germany), German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, 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

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

Elena R. Meskina, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Pediatric Infections, Department of Therapy, M.F. Vladimirov 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

ЮБИЛЕИ

- Поздравление руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.Ю. Поповой 7
- Поздравление академика-секретаря Отделения медицинских наук РАН академика РАН В.И. Стародубова 8
- Зверев В.В.**
100 лет «Журналу микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» 9
- Брико Н.И., Соколова Т.В.**
Жизнь — в профессии, профессия — в жизни (к 120-летию со дня рождения профессора И.И. Ёлкина) 11

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Попова А.Ю., Щелканов М.Ю., Крылова Н.В., Белик А.А., Семейкина Л.М., Запорожец Т.С., Смоленский В.Ю., Персиянова Е.В., Просянникова М.Н., Белов Ю.А., Иунихина О.В., Потт А.Б., Хомичук Т.Ф., Симакова А.И., Абрамова С.А., Романова О.Б., Детковская Т.Н., Крыжановский С.П., Беседнова Н.Н.**
Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19* 19
- Файзулов Е.Б., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Амму Ю.И., Смирнова Д.И., Хохлова Д.М., Дроков А.О., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Воронцова М.С., Ленева И.А., Свитич О.А., Зверев В.В.**
Однократная интраназальная иммунизация аттенуированным Ухань-подобным SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную перекрестную защиту от заражения вариантами Delta и Omicron* 36
- Волкова Н.А., Михеева И.В., Мельникова А.А., Акимкин В.Г.**
Ретроспективная оценка результатов иммунодиагностики туберкулеза у детей* 52
- Останкова Ю.В., Бальде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Рейнгардт Д.Э., Щемелев А.Н., Давыденко В.С., Ануфриева Е.В., Эсауленко Е.В., Тоголян Арег А.**
Вариабельность rgeCore/Core-региона вируса гепатита В у беременных женщин в Гвинейской Республике* 61
- Макарова М.А., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А.**
Интегративный подход к оценке патогенного потенциала штаммов *Escherichia coli*, выделенных из мочи* 72
- Мионов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Платонов А.Е.**
Схема мультилокусного секвенирования-типирования для характеристики *Borrelia miyamotoi* — возбудителей безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза* 80
- Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Баязитова Л.Т., Хусаинова Р.М., Чазова Т.А., Тюпкина О.Ф., Никитина Е.В., Цветкова И.А.**
Характеристика бактерионосительства *Streptococcus pneumoniae* в детской популяции* 89
- Питерский М.В., Ходаков О.А., Михеева Т.В., Билалова Н.В., Конькова-Рейдман А.Б., Захарова Ю.А., Семенов А.В.**
Филогенетическое положение и генетические особенности вируса иммунодефицита человека-1 в центральной нервной системе* 100
- Топорков А.В., Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Бородай Н.В., Молчанова Е.В., Бондарева О.С., Антонов А.С.**
Изучение особенностей циркуляции и свойств вируса Западного Нила в России в 2022 году* 114
- Левина А.С., Репкова М.Н., Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Мазуркова Н.А., Зарытова В.Ф.**
Наноконпозиты, состоящие из наночастиц диоксида титана, антисмысловых олигонуклеотидов и фотоактивируемых групп, как агенты для эффективного воздействия на нуклеиновые кислоты 127
- Давуд Али А.**
Подавление протеомной активности, связанной с пациентами с COVID-19, страдающими астмой, на основе паттерна экспрессии генов 133
- ОБЗОРЫ**
- Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Алиев М.Р., Щелканов М.Ю.**
Клеточные культуры в вирусологии: от прошлого к будущему 143
- НЕКРОЛОГИ**
- Памяти Бориса Савельевича Народицкого (20 сентября 1941 года – 10 января 2024 года) 154
- Информация Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов** 156

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

CONTENTS

ANNIVERSARIES

Congratulations from the Head of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing A.Yu. Popova.....	7
Congratulations from the Academician-Secretary of the Department of Medical Sciences of the Russian Academy of Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences V.I. Starodubov.....	8
Zverev V.V. 100 years of the Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.....	9
Briko N.I., Sokolova T.V. Life is in profession, profession is in life (to the 120 th anniversary of Professor I.I. Elkin).....	11

ORIGINAL RESEARCHES

Popova A.Yu., Shchelkanov M.Yu., Krylova Natalia V., Belik A.A., Semeikina L.M., Zaporozhets T.S., Smolenskiy V. Yu., Persianova E.V., Prosyannikova M.N., Belov Yu.A., Lunikhina O.V., Pott A.B., Khomichuk T.F., Simakova A.I., Abramova S.A., Romanova O.B., Detkovskaya T.N., Kryzhanovskiy S.P., Besednova N.N. Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai during the COVID-19 pandemic*.....	19
Faizuloev E.B., Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Ammour Yu.I., Smirnova D.I., Khokhlova D.M., Drovkov A.O., Pankratov A.A., Trunova G.V., Khokhlova V.A., Vorontsova M.S., Leneva I.A., Svitich O.A., Zverev V.V. Single intranasal immunization with attenuated Wuhan-like SARS-CoV-2 provides highly effective cross-protection against Delta and Omicron variants of concern*.....	36
Volkova N.A., Mikheeva I.V., Melnikova A.A., Akimkin V.G. Retrospective evaluation of the results of immunodiagnostics for tuberculosis in children*.....	52
Ostankova Yu.V., Balde T.A.L., Boumbaly S., Serikova E.N., Zueva E.B., Reingardt D.E., Schemelev A.N., Davydenko V.S., Anufrieva E.V., Esaulenko E.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus preCore/Core region variability in pregnant women in the Republic of Guinea*.....	61
Makarova M.A., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A. An integrative approach to assessing the pathogenic potential of <i>Escherichia coli</i> strains isolated from urine*.....	72
Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., Platonov A.E. Multilocus sequencing-typing scheme for characterization of <i>Borrelia miyamotoi</i> — the erythema-free ixoid tick-borreliosis pathogens*.....	80
Isaeva G.Sh., Zaripova A.Z., Bayazitova L.T., Khusainova R.M., Chazova T.A., Tyupkina O.F., Nikitina E.V., Tsvetkova I.A. Characteristics of <i>Streptococcus pneumoniae</i> carriage in the pediatric population*.....	89
Piterskiy M.V., Khodakov O.A., Mikheeva T.V., Bilalova N.V., Konkova-Reidman A.B., Zakharova Yu.A., Semenov A.V. Phylogenetic position and genetic features of HIV-1 in CNS*.....	100
Toporkov A.V., Putintseva E.V., Udovichenko S.K., Boroday N.V., Molchanova V.E., Bondareva O.S., Antonov A.S. Study of the circulation and properties of the West Nile virus in Russia in 2022*.....	114
Levina A.S., Repkova M.N., Mazurkov O.Yu., Makarevich E.V., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. Nanocomposites consisting of titanium dioxide nanoparticles, oligonucleotides, and photoactive groups as agents for effective action on nucleic acids.....	127
Dawood A. Dampening of proteomics activity associated with the COVID-19 patients afflicted with asthma based on gene expression pattern.....	133
REVIEWS	
Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Aliev M.R., Shchelkanov M.Yu. The cell cultures in virology: from the past to the future.....	143
OBITUARIES	
In memory of Boris Savelievich Naroditsky (September 20, 1941 – January 10, 2024).....	154
Information of the Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists.....	156

* The article is published in Russian and English on the journal's website: <https://www.microbiol.orie.ru>.

ЮБИЛЕИ



**ПОЗДРАВЛЕНИЕ
РУКОВОДИТЕЛЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ
В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

Уважаемые коллеги!

Издание «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» отмечает 100-летний юбилей с даты выхода в свет своего первого номера.

С первых выпусков и до настоящего времени журнал является научно-практическим изданием, всесторонне освещающим актуальные проблемы медицинской микробиологии, прикладной иммунологии, эпидемиологии и инфекционных болезней, и обеспечивает популяризацию новейших результатов фундаментально-прикладных исследований, направленных на обеспечение контроля, профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

Главными редакторами, членами редакционного совета и редакционной коллегии журнала, авторами публикаций в разные годы были учёные с мировым именем, специалисты органов и организаций Роспотребнадзора, Российской академии медицинских наук, Российской академии наук, Минздрава Российской Федерации, микробиологи, эпидемиологи, вирусологи, иммунологи, организаторы здравоохранения.

С момента создания журнала во главе стояли такие выдающиеся учёные, как Л.А. Тарасевич, Л.В. Громашевский, И.Л. Кричевский, И.И. Рогозин, Б.Ф. Семенов, В.Д. Тимakov, И.И. Ёлкин. В журнале публиковались работы великих деятелей отечественной науки: М.П. Чумакова, А.А. Смородинцева, Л.А. Зильбера, З.В. Ермольевой, В.М. Жданова, С.В. Прозоровского и других.

За годы существования журнал превратился в авторитетное периодическое издание, на страницах которого обсуждаются актуальные вопросы инфекционных заболеваний. Издание «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» первым осветило такую важную болезнь, как ВИЧ-инфекция, опубликовало статьи по ликвидации полиомиелита.

Успех журнала достигается непрерывной работой редакционной команды и авторов, а также главного редактора журнала академика Российской академии наук Виталия Васильевича Зверева. Благодаря плодотворному труду журнал входит в перечни научных журналов и библиографических баз данных рецензируемой научной литературы, пользуется компетентностью в учёных кругах, у медицинской общественности, студентов и аспирантов и востребован читателями.

Уважаемые сотрудники журнала, авторы и читатели!

От всей души поздравляю вас с юбилеем и выражаю уверенность в том, что и последующие публикации на страницах журнала будут так же своевременны, оригинальны и востребованы широкой читательской аудиторией.

Желаю вам крепкого здоровья, неиссякаемого энтузиазма и издательского долголетия, человеческого счастья и всяческого благополучия.

*Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации*

А.Ю. Попова



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Отделение Медицинских Наук



Коллективу «Журнала микробиологии,
эпидемиологии и иммунобиологии»

Дорогие друзья!

Исполнилось 100 лет со дня основания одного из старейших научно-практических периодических изданий Советского Союза и современной России — «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии».

Основанный в 1924 году, журнал рассматривает актуальные проблемы мировой науки в области эпидемиологии, микробиологии, вирусологии, иммунобиологии, в том числе иммунодиагностики и иммунопрофилактики, и обеспечивает синтез новейших результатов фундаментальных и прикладных научных исследований, направленных на обеспечение контроля, профилактики и лечения болезней инфекционной природы.

Журнал охватывает вопросы инфекционных заболеваний человека с точки зрения изучения патогенных микроорганизмов во взаимосвязи с иммунным ответом организма человека, окружающей средой, внутри- и межвидовыми взаимодействиями, а также взаимосвязанными эволюционными процессами и общественным здоровьем.

Журнал предназначен для врачей, эпидемиологов, научных работников, преподавателей, аспирантов и студентов, чьи профессиональные интересы включают вопросы применения, разработки и внедрения технологий для поддержания инфекционной безопасности населения.

Журнал в разные годы возглавляли крупные ученые, по праву считающиеся основателями современных направлений медицинской микробиологии, биотехнологии, эпидемиологии и иммунологии. В состав первой редакционной коллегии журнала входили известные учёные — А.И. Абрикосов, С.В. Коршун, И.Л. Кричевский, Ф.Я. Чистович и др. Членами редколлегии журнала в разные годы являлись академики В.Д. Беляков, А.Ф. Билибин, И.Н. Блохина, С.В. Прозоровский, П.А. Вершилова, Г.В. Выгодчиков, В.М. Жданов, П.Ф. Здродовский и др.

С 2011 года главным редактором журнала является академик РАН В.В. Зверев.

В 2019 году издателем журнала стал Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, возглавляемый академиком РАН В.Г. Акимкиным. Совместные усилия редакционной коллегии и учредителя журнала способствовали стремительному росту международной значимости издания.

За 100 лет существования ЖМЭИ огромное число исследователей были авторами оригинальных статей. Многие работы, заслужившие впоследствии мировое признание, появились на страницах журнала.

Неизменна традиция журнала публиковать материалы, необходимые для развития медицинской науки и практического здравоохранения. В годы пандемии COVID-19 (2020–2023 гг.) журнал вместе с учёными, сотрудниками Роспотребнадзора и практического здравоохранения был на первой линии борьбы с инфекцией, освещая достижения науки и практики в области эпидемиологического надзора и контроля, разработки новейших методов и средств диагностики и профилактики инфекции.

Отделение медицинских наук РАН поздравляет редакционную коллегию со столетием журнала ЖМЭИ, желает плодотворной работы, направленной на дальнейшее развитие медицинской науки.

Академик-секретарь Отделения
медицинских наук РАН
академик РАН

В.И. Стародубов



ЮБИЛЕИ

100 лет «Журналу микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии»



Дорогие коллеги, друзья, в этом году исполняется 100 лет со дня основания научного издания «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии».

Наш журнал был организован в 1924 году под названием «Журнал микробиологии, патологии и инфекционных болезней». В состав первой редколлегии журнала вошли выдающиеся учёные того времени: А.И. Абрикосов, О.О. Гартох, Г.А. Ивашенцев, С.В. Коршун, И.Л. Кричевский, В.А. Любарский, Ф.Я. Чистовский, Г.В. Эпштейн. Первым ответственным редактором стал выдающийся учёный с огромным редакторским опытом и широчайшей научной эрудицией — Лев Александрович Тарасевич, изучавший основы естествознания у таких корифеев науки, как И.И. Мечников, А.О. Ковалевский, И.М. Сеченов, Н.А. Умов и др. Л.А. Тарасевич получил второе медицинское образование в Париже, был автором двух диссертаций, большого числа научных публикаций, в том числе «Руководства по бактериологии и общей патологии». Во время создания журнала Л.А. Тарасевич руководил Государственным научным институтом народного здравоохранения, в состав которого входили 8 институтов, в том числе позднее названный его именем Институт контроля сывороток и вакцин. Это, а также деятельное сотрудничество и редакторство в научных журналах позволило Л.А. Тарасевичу с первых же выпусков журнала сделать его одним из ведущих научных медицинских периодических изданий страны, развивающим научно-практическое направление в биологии и медицине.

«Журнал микробиологии, патологии и инфекционных болезней» с момента своего основания стал проводником передовых идей в области инфекционной патологии. В это время тематика журнала отражала особенности состояния и развития микробиологии в Советском Союзе. Опыт борьбы с эпидемиями инфекционных болезней фиксировал внимание микробиологов на вопросах эпидемиологии. Как писал в своей статье В.А. Любарский (1927 г., том 4), «в большей или меньшей степени все русские микробиологи сделались также эпидемиологами». Эта эволюция совпала с профилактическими устремлениями российских медиков, исходящими из изучения сущности инфекций, мер борьбы с ними, а также глубокого постижения теоретических основ иммунитета и развития иммунологии.

Изучая номера журнала от первых до последних, убеждаешься не только во всеобъемлющей географии публикуемых статей, но и в их верности не случайно выбранным темам, которые в своё время и определили переименование издания в «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» (ЖМЭИ).

В силу естественного хода событий менялись главные редакторы журнала, составы редколлегий и редакционных советов, стиль публикаций, язык статей. Немецкий и французский языки в резюме сменил английский. Неизменной оставалась традиция соответствия публикуемых материалов требованиям актуальности для здравоохранения страны. Никакие общественные потрясения не останавливали выпуск журнала и не сужали географию его распространения. Так, в годы Великой Отечественной войны ЖМЭИ не потерял ни одного номера (в 1942 и 1943 гг. вышло несколько сдвоенных номеров), в годы распада Советского Союза журнал регулярно распространялся в странах СНГ.

После Л.А. Тарасевича в разные годы журнал возглавляли выдающие советские и российские учёные И.Л. Кричевский, В.А. Любарский, А.М. Криницкий, И.И. Rogozin, Л.В. Громашевский, В.Д. Тимаков, И.И. Ёлкин, Б.Ф. Семенов. Членами редколлегии являлись В.И. Агафонов, А.К. Акатов, В.Д. Беляков, А.Ф. Билибин, И.Н. Блохина, П.Н. Бургасов, П.А. Вершилова, А.А. Воробьёв, Г.В. Выгодчиков, В.М. Жданов, П.Ф. Здродовский, В.М. Здравомыслов, М.Н. Лебедева, Р.В. Петров, В.И. Покровский, С.В. Прозоровский, Г.П. Руднев, А.А. Смородинцев, В.Д. Соловьёв, А.А. Тотолян, Н.Н. Филатов, Н.Д. Ющук. Это далеко не полный список, но в нём учёные, по праву считающиеся основателями современных направлений микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. Среди них два президента РАМН, академики и члены-корреспонденты РАМН и РАН, обладатели высших наград СССР и Российской Федерации, лауреаты Ленинской и Государственной премий. Среди них — исследователи, выделившие вирус клещевого энцефалита, сформулировавшие концепцию контроля инфекции вакцинацией, которая обеспечила ликвидацию оспы в мире и полиомиелита в России; учёные, установившие закономерности формирования иммунного ответа, участия в нём клеточных и гуморальных факторов; разработчики современных

диагностических, вакцинных и лекарственных препаратов, создатели теоретических основ микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии.

За 100 лет огромное число исследователей стали авторами оригинальных научных статей в ЖМЭИ. Невозможно назвать всех, как невозможно в короткой юбилейной статье сделать обзор всех инфекций и патогенов, вакцин и других иммунобиологических препаратов, всех проблем эпидемиологии, микробиологии и иммунологии, которым отводилось место на страницах нашего журнала или посвящались отдельные номера. Упомяну лишь некоторые из них. В 1926 г. ЖМЭИ публикует статью Н.Ф. Гамалеи «О природе бактериофагов», а в 1954 г. — выдержки из его последней лекции «Иммуногенез в коже». В 1937 г. в журнале появляется серия статей Л.А. Зильбера и соавторов о противовирусном иммунитете, в 1944 г. — его обзорная статья о механизмах этого иммунитета, а в 1945 г. — теоретическая статья, положившая начало концепции вирусной теории рака «О природе злокачественных опухолей». В 1945 г. ЖМЭИ представляет работу майора медицинской службы В.М. Жданова «Этиология инфекционного гепатита», а в 1987 г. посмертно публикует его последнюю статью «Лабораторная диагностика СПИД». В этом же номере — статья З.К. Янкиной, В.И. Покровского и В.В. Покровского «Эпидемиологическое расследование первого случая СПИД, выявленного у гражданина СССР». В 1927 г. в ЖМЭИ З.В. Ермольева публикует свою первую работу «Вибрионы холеры в Ростове-на-Дону», а в 1944 г. — знаменитую статью «Пенициллин-крустозин». В 1937–1944 гг. в журнале регулярно появляются статьи М.П. Чумакова, В.Д. Соловьёва, А.А. Смородинцева о природе клещевого энцефалита и гриппа, об иммунитете против этих инфекций и их профилактике. В 1950-х и 1960-х гг. в ЖМЭИ большое количество статей посвящено борьбе с полиомиелитом, гриппом, корью, эпидемическим паротитом, краснухой. Появляются публикации о создании вакцин против этих инфекций, их испытаниях, особенностям постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Авторы этих публикаций — выдающиеся отечественные учёные М.П. Чумаков, В.Д. Соловьёв, А.А. Смородинцев, О.Г. Анджапаридзе и их ученики. В 1960-е и 1970-е гг. журнал следит за успехами Программы глобальной ликвидации оспы в мире, публикует

отчёты и научные статьи о ходе программы и, наконец, декларацию глобальной комиссии по сертификации ликвидации оспы на Земле, подписанную в том числе советским учёным С.С. Маренниковой (1979 г.). В последние годы журнал старается освещать наиболее актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, вирусных гепатитов, гриппа, коронавирусов, особо опасных инфекций.

Следует отметить, что, кроме оригинальных статей, ЖМЭИ всегда публиковал и публикует много других необходимых для учёных и практиков материалов. Это информация о научных съездах, симпозиумах и конференциях, отчёты о работе Общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов, рецензии на важнейшие научные издания, материалы по истории науки.

Журнал свято хранит традицию уважительного отношения к памяти учёных, внёсших вклад в развитие отражаемых журналом проблем, что, конечно, оказывает влияние на поддержание преемственности и этического начала в науке. Можно сказать, что эта традиция началась с номера 4 журнала за 1927 г., изданного сразу же после безвременной кончины первого редактора журнала Л.А. Тарасевича и посвящённого его памяти. В нём опубликованы личные воспоминания О.Н. Мечниковой, Этьена Бюрне, проф. Бухштаба, проф. Ф.Я. Чистовича, описывающие живой образ большого учёного, человека феноменальных дарований с прекрасными душевными качествами. В этом же номере в память своего первого редактора сотрудники журнала опубликовали факсимиле двух писем Луи Пастера русскому доктору Войнову. А в 1943 г. после прорыва блокады Ленинграда номер журнала был полностью предоставлен работам сотрудников Ленинградских институтов и посвящён их погибшим во время блокады коллегам. Эти благородные жесты не могут вызвать у современных авторов и читателей ЖМЭИ чувства сопричастности к высоким идеалам и благодарности за это журналу. И мы все верим, что наш журнал ещё долго будет хранить свои традиции, процветать, становиться лучше и быть проводником современных знаний в области микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.

*Главный редактор «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии»
академик РАН В.В. Зверев*

ЮБИЛЕИ

Обзорная статья
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-425>



Жизнь — в профессии, профессия — в жизни (к 120-летию со дня рождения профессора И.И. Ёлкина)

Брико Н.И.✉, Соколова Т.В.

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

Аннотация

В статье представлен жизненный и творческий путь известного отечественного эпидемиолога, организатора здравоохранения, общественного деятеля, авторитетного учёного и педагога профессора И.И. Ёлкина.

Ключевые слова: И.И. Ёлкин, эпидемиология

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: Брико Н.И., Соколова Т.В. Жизнь — в профессии, профессия — в жизни (к 120-летию со дня рождения профессора И.И. Ёлкина). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):11–18.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-425>

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

Review
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-425>

Life is in profession, profession is in life (to the 120th anniversary of Professor I.I. Elkin)

Nikolay I. Briko✉, Tatiana V. Sokolova

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

Abstract

The life and the career of a well-known Russian epidemiologist, health care organizer, public figure, authoritative scientist and pedagogue Professor I.I. Elkin has been portrayed in the article.

Keywords: I.I. Elkin, epidemiology

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: Briko N.I., Sokolova T.V. Life is in profession, profession is in life (to the 120th anniversary of Professor I.I. Elkin). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):11–18.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-425>

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

В октябре 2023 г. исполнилось 120 лет со дня рождения известного отечественного эпидемиолога, организатора здравоохранения, авторитетного учёного и педагога, главного эпидемиолога Северо-Западного, Калининского и 1-го Прибалтийского фронтов в годы Великой Отечественной войны, главного редактора «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии», заслуженного деятеля наук Узбекской ССР, профессора Ивана Ивановича Ёлкина (рис. 1).

Остановившаяся на главных моментах жизни и творческой деятельности И.И. Ёлкина, невольно оглядываешься на путь, пройденный отечественной эпидемиологией в прошлом веке.

Иван Иванович Ёлкин родился 13 октября 1903 г. в деревне Большая Горка Кологривского уезда Костромской губернии. В 1921 г. окончил школу и по путёвке губернского отдела профессионального образования был направлен учиться на медицинский факультет Нижегородского государственного университета. После окончания университета и годичной специализации в Москве возглавил лабораторию гигиены труда в краевом институте по изучению и борьбе с профессиональными заболеваниями. Вскоре был назначен заместителем директора по учебной части Горьковского медицинского института, где одновременно с организацией и контролем учебного процесса занимался педагогической деятельностью.

С 1934 по 1937 г. И.И. Ёлкин работал старшим областным государственным санитарным инспектором и заместителем заведующего областным отделом здравоохранения Кировской области (рис. 2).

В 1937 г. И.И. Ёлкин был назначен Советом народных комиссаров СССР главным государственным санитарным инспектором Наркомздрава СССР.

В период работы во Всесоюзной государственной санитарной инспекции (ВГСИ) И.И. Ёлкин занимался вопросами текущего и предупредительного санитарного надзора, принимал участие в создании Противозидемического управления Наркомздрава СССР, на страницах журнала «Гигиена и санитария» выступал с предложениями по оптимизации работы ВГСИ и критическими замечаниями. Большую озабоченность главного санитарного инспектора в 1938 г. вызывал недостаток санитарных станций в стране: «...в первую очередь — в РСФСР, как наиболее отставшей в строительстве этой сети». Благодаря активной позиции Наркомздрава СССР по этому вопросу в 1939 г. было запланировано довести количество санитарных учреждений в СССР до 1620, в том числе в РСФСР — до 800.

В октябре 1939 г. И.И. Ёлкин был переведён на работу директором Саратовского противочумного института «Микроб». С 1940 г. по июнь 1941 г.



Рис. 1. Иван Иванович Ёлкин.

Fig. 1. Ivan I. Elkin.

руководил лабораторией в Московском институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, исполнял обязанности учёного секретаря института.

С первых дней Великой Отечественной войны И.И. Ёлкин находился в действующей армии. В июне 1941 г. был назначен начальником санитарно-дезинфекционного поезда. В августе 1941 г. переведён на должность армейского эпидемиолога 52-й отдельной армии. С февраля 1942 г. — главный эпидемиолог Северо-Западного, Калининского, затем 1-го Прибалтийского фронтов.

Во время Великой Отечественной войны И.И. Ёлкин занимался большой практической работой в действующей армии. В первый период войны, когда развёртывание медицинских учреждений было нарушено ходом боевых действий, он принимал участие в формировании и отлаживании работы санитарно-противозидемических учреждений. С началом перехода советских войск в наступление он успешно обеспечивал противозидемическую защиту войск. Большую часть служебного времени И.И. Ёлкин проводил в передовых частях, контролируя чёткое выполнение плана противозидемической работы. Принимал непосредственное участие в ликвидации вспышек инфекционных болезней в освобождённых от оккупации районах. Провёл ряд фронтовых конференций по актуальным противозидемическим вопросам. Организовывал в армиях и на фронте подготовку кадров — работников санитарно-противозидемической службы. В результате грамотного руководства противозидемическими мероприятиями заболеваемость в войсках была меньше заболеваемости во время Первой мировой войны.

За успешную работу в действующей армии И.И. Ёлкин был награждён боевыми наградами. В представлении к первой боевой награде —



Рис. 2. Группа государственных санитарных инспекторов на 1-м Краевом совещании.

Старший госсанинспектор Кировской области И.И. Ёлкин — в середине первого ряда.

Fig. 2. A group of state sanitary inspectors at the 1st Regional meeting.

Senior State Sanitary Inspector of the Kirov Region I.I. Elkin — first row, middle.

Ордену Отечественной войны II степени — давалось краткое описание его заслуг: «Подполковник м/с т. Елкин И.И. — высококвалифицированный специалист эпидемиолог. Работа т. Елкина направлена на противоэпидемическую защиту войск. Благодаря большой, энергичной работе т. Елкина удалось ликвидировать эпидемию сыпного тифа зимой 1942–1943 гг. в 3 ударной армии. Хорошо организовал противоэпидемическую защиту войск весной 1943 г. в 39 армии и во время Духовщинской операции. Т. Елкин сумел организовать систематическую санитарную разведку вновь занятой территории противника, санитарную обработку войск в наступательной операции. Благодаря хорошей организации противоэпидемической защиты войск в 1943 г. в войсках Калининского фронта нет эпидзаболеваний».

В годы Великой Отечественной войны И.И. Ёлкин активно изучал опыт противоэпидемического обеспечения войск, проводил научные исследования. На основании глубокого анализа были обстоя-

тельно изучены вопросы противоэпидемического обеспечения наступательных операций, эпидемиологические особенности и профилактика сыпного тифа, брюшного тифа, дизентерии, инфекционной желтухи, туляремии, лептоспироза. Результаты научных исследований И.И. Ёлкина представил к защите в 1944 и 1947 гг. На конкурсе трудов по опыту советской медицины в годы Великой Отечественной войны докторская диссертация И.И. Ёлкина была удостоена диплома и 2-й премии.

С войсками 1-го Прибалтийского фронта И.И. Ёлкин дошёл до Восточной Пруссии. В июне 1945 г. был направлен в Германию на должность начальника Санитарно-эпидемиологического отделения Отдела здравоохранения Советской военной администрации в Германии. По ходатайству Наркомздрава СССР (1946) был демобилизован из Вооружённых сил и получил назначение в Институт биологической профилактики инфекций, преобразованный позднее в Институт пенициллина и других антибиотиков.

С 1946 по 1950 г. И.И. Ёлкин работал в новой для себя области — разрабатывал вопросы эффективности различных лекарственных форм и методов применения антибиотиков. Под его руководством впервые в СССР начались широкие исследования по аэрозолям антибиотиков. В 1955 г. совместно с С.И. Эйдельштейном была написана монография «Аэрозоли антибиотиков, их получение и клиническое применение».

В 1950–1955 гг. И.И. Ёлкин руководил кафедрой эпидемиологии Центрального института усовершенствования врачей, был главным редактором Министерства здравоохранения СССР. С 1955 г. и до конца жизни заведовал кафедрой эпидемиологии 1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. Одновременно (1966–1968) работал заместителем директора по науке Центрального института эпидемиологии Минздрава СССР.

На всём протяжении жизненного и творческого пути И.И. Ёлкин проводил большую организационную, руководящую, научную и учебно-методическую работу. Список трудов И.И. Ёлкина насчитывает более 250 работ, среди них монографии, руководства, учебники.

В 1956 г. под редакцией И.И. Ёлкина в соавторстве с другими специалистами вышло «Руководство по защите населения от бактериологического оружия». Составители руководства использовали «Материалы судебного процесса по делу бывших военнослужащих японской армии, обвиняемых в подготовке и применении бактериологического оружия», «Доклад международной научной комиссии по расследованию фактов бактериологической войны в Корее и Китае», другие источники, а также собственный практический опыт. К работе над изданием И.И. Ёлкин приступил после возвращения из командировки в Корейскую Народно-Демократическую Республику. За противоэпидемическую защиту населения правительством КНДР в 1951 г. он был награждён орденом Государственного знамени II степени.

И.И. Ёлкин много и плодотворно работал над теоретическими вопросами эпидемиологии, уделяя большое внимание таким проблемам, как предмет и метод эпидемиологии, движущие силы эпидемического процесса, социальные и природные факторы, обуславливающие количественные и качественные изменения эпидемического процесса, история эпидемиологии. Серия работ по теоретическим вопросам обобщена в монографии «Очерки теории эпидемиологии» (1960).

И.И. Ёлкину принадлежит ряд точных определений теоретических понятий эпидемиологии. Не отрицая понятия «эпидемический процесс», которое было дано Л.В. Громашевским, он предложил новую интерпретацию: эпидемический процесс — это ряд связанных и вытекающих один из другого эпи-

демических очагов. Дополнил число законов общей эпидемиологии законом о природной очаговости и работал над усовершенствованием эпидемиологической классификации инфекционных болезней.

И.И. Ёлкин сформулировал собственное определение эпидемиологии как науки об объективных закономерностях, лежащих в основе возникновения, распространения и предупреждения инфекционных заболеваний в человеческом обществе, а также методах профилактики и ликвидации этих болезней. Впоследствии оно было положено в основу определения, принятого на международном эпидемиологическом симпозиуме в Праге в 1960 г.

В 1960-е гг. И.И. Ёлкин углублённо разрабатывал теоретические, организационные и методические основы профилактики и борьбы с инфекционными болезнями, возможность ликвидации отдельных инфекций (научный труд в виде книги «Проблемы ликвидации инфекционных болезней» вышел в 1966 г.).

Благодаря работам советских учёных возможность ликвидации инфекционных болезней была научно обоснована. Убеждённости в справедливости этих выводов, а также бесценный опыт отечественного здравоохранения по ликвидации оспы в СССР в 1930-е гг. позволила академику АМН СССР В.М. Жданову выступить в ВОЗ с предложением принять глобальную программу ликвидации натуральной оспы, которая успешно завершилась в 1980 г..

И.И. Ёлкин до конца оставался сторонником «классической» эпидемиологии, решительно отстаивал научную позицию, заключающуюся в том, что социальные условия жизни общества являются главной движущей силой эпидемического процесса и определяют интенсивность, характер течения и прекращение эпидемического процесса, а значит, и уровень заболеваемости.

Большое значение И.И. Ёлкин придавал истории эпидемиологии — самостоятельной отрасли медицинской науки, имеющей специфический объект и метод познания, а также самобытную картину исторического развития научных взглядов, теорий, фактов. Им написано немало работ о жизни и творческой деятельности учёных, с работой которых были связаны важные события в научном познании окружающего мира. В многотомном руководстве по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней (1965, Т. 5) написана глава «История эпидемиологии». В 1974 г. в соавторстве с В.В. Фроловой издана книга «И.А. Деминский», в которой приведены биография и описание врачебной и научной деятельности Ипполита Александровича Деминского, посвятившего свою короткую жизнь борьбе с особо опасными инфекциями.

На протяжении ряда лет И.И. Ёлкин и В.К. Яшкуль занимались эпидемиологической географией.

В 1961 г. была создана научная лаборатория, где были разработаны основные положения этого нового направления науки, сформулировано учение о нозоареале, проведены исследования по нозогеографии и краевой эпидемиологии многих инфекционных болезней. В 1964 г. работа по эпидемиологической географии была удостоена диплома почёта и бронзовой медали ВДНХ.

В перечне трудов И.И. Ёлкина, написанных в соавторстве с другими специалистами, — статьи, посвящённые опыту работы санитарно-эпидемиологических станций, поликлиник, участковых врачей, методам эпидемиологического анализа и др. Среди вопросов частной эпидемиологии наибольшее внимание уделялось проблемам кишечных инфекций. Совместно с О.А. Крашенинниковым издана монография «Дизентерия» (1975).

Основным итогом педагогической деятельности И.И. Ёлкина служат учебники и руководства, выдержавшие несколько изданий и переведённые на английский и китайский языки. Примером сочетания большого опыта педагогической работы и глубоких знаний стала серия работ «Педагогические раздумья», которые были опубликованы в «Журнале микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» в 1970-е гг.

На кафедре эпидемиологии 1-го ММИ им. И.М. Сеченова И.И. Ёлкин проработал 27 лет. За это время коллективом кафедры была создана единая учебно-методическая система преподавания эпидемиологии в медицинских вузах СССР. Кафедра стала признанным методическим центром, где регулярно повышали квалификацию преподаватели медицинских вузов от ассистентов до заведующих кафедрами.

В 1968 г. сотрудники кафедры эпидемиологии 1-го ММИ им. И.М. Сеченова принимали заведующих кафедрами эпидемиологии и институтов усовершенствования врачей — делегатов семинара по вопросам теории эпидемиологии и её преподавания, который проходил в Центральном НИИ эпидемиологии МЗ СССР. В работе семинара приняли участие заведующие кафедрами эпидемиологии 23 медицинских институтов и институтов усовершенствования врачей, а также заведующие эпидемиологическими отделами 28 институтов эпидемиологии и микробиологии, республиканских институтов, представители эпидемиологических служб МЗ СССР, РСФСР и др.

На семинаре обсуждались основные направления в развитии эпидемиологии на современном этапе, а также состояние преподавания эпидемиологии на кафедрах вузов. С докладами выступали крупные советские эпидемиологи, среди них профессор И.И. Ёлкин. В прениях по докладам выступали участники семинара, в том числе академик АМН СССР Л.В. Громашевский и академик АМН

СССР М.Н. Соловьёв — сотрудники первой кафедры эпидемиологии, организованной Д.К. Заболотным в 1920 г.

И.И. Ёлкин занимался не только подготовкой будущих специалистов в медицинских вузах, но и понимал необходимость расширения профессионального кругозора врачей других специальностей. Такую возможность предоставляла «Большая медицинская энциклопедия», ценность которой заключалась в получении специалистом информации по любому вопросу из области других специальностей. В «Большой медицинской энциклопедии» И.И. Ёлкиным написаны разделы «Эпидемиологический эксперимент» (1964, Т. 34), «Санитарная охрана границ» (1963, Т. 29), «Противоэпидемическое обеспечение войск» (1962, Т. 26).

В 1973 г. под редакцией И.И. Ёлкина в помощь практическим врачам вышло двухтомное руководство «Общая и частная эпидемиология», к работе над которым он сумел привлечь ведущих учёных страны: академика АМН СССР, профессора Н.Н. Жукова-Вережникова, члена-корреспондента АМН СССР профессора Т.Е. Болдырева, члена-корреспондента АМН СССР профессора И.И. Рогозина и др. Издание вызвало большой интерес у широкого круга читателей и оставалось настольной книгой нескольких поколений практических врачей.

Авторитет учёного, огромный практический опыт, профессиональная открытость и доброжелательность И.И. Ёлкина привлекали в научную школу эпидемиологии молодых учёных. Среди них были представители стран народной демократии — И. Ведреш и К. Шолт (Венгрия), Юй-Чен и Фэн Сюэ-Уй (Китай), И. Мурешан (Румыния). Много соискателей было из республик СССР: Н.И. Лебедев (Белоруссия), А.Я. Ухов (Украина), Р.П. Богачева (Латвия), П.Г. Киреев (Казахстан), В.З. Елфимова (Таджикистан), И.Ю. Гасанов (Туркмения), З.К. Каримов, М.В. Невский, М.К. Шарипов, З.М. Аминзаде, Я.Г. Пулатов, А.К. Юлдашев, Р.А. Бахрамова, А.М. Кадыров (Узбекистан) и др.

Под руководством профессора И.И. Ёлкина выполнено более 70 диссертаций, из них 19 докторских. Учениками Ивана Ивановича проведены исследования по нозогеографии, краевой эпидемиологии бруцеллеза (Черченко И.И., 1962; Асланян Р.Г., 1967), тениаринхоза (Суворов В.Ю., 1965), брюшного тифа и паратифозных заболеваний (Солодовников Ю.П., 1965; Мухутдинов И.З., 1966; Ухов А.Я., 1974), бактериальной дизентерии (Крашенинников О.А., 1969; Падалкин В.П., 1970), сальмонеллезов (Лебедев Н.И., 1972).

Выявлены особенности эпидемического процесса брюшного тифа в условиях промышленно развивающихся районов Западной Сибири, показана высокая эффективность массовой иммунизации населения (Замотин Б.А., 1971). Рассмотрены

роль и значение бактерионосителей в эпидемиологии брюшного тифа (Олькова М.П., 1964). Изучены вопросы активного выявления больных бактериальной дизентерией (Фролов В.И., 1958), причины перехода острой дизентерии в затяжную (Ковалева Е.П., 1957), усовершенствован комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий при дизентерии (Жогова М.А., 1958; Лебедев В.И., 1964; Анкирская А.С., 1966; Павлова Л.И., 1972).

Изучены особенности эпидемического процесса инфекционного гепатита, показана высокая эпидемиологическая эффективность гомологичных сывороточных препаратов (Спотаренко С.С., 1965 и 1971; Степанов Г.П., 1962).

Благодаря работам В.А. Килессо (1975) значительно расширились представления об эпидемиологии сальмонеллёзов. Разработана и осуществлена система эпидемиологического надзора за сальмонеллёзами. Проведены доклинические испытания санации хронического сальмонеллёзного носительства (Ефимова В.З., 1972).

Изучены этиология и эпидемиологические особенности коли-инфекции, дан анализ факторов, способствующих распространению коли-энтеритов в стационарах и дошкольных учреждениях (Быченко В.Д., 1969; Куралесина В.В., 1971).

В контролируемых эпидемиологических исследованиях изучена специфическая профилактика кори живыми и убитыми вакцинами (Болотовский В.М., 1967). Оценены интенсивность, продолжительность постпрививочных реакций и напряжённость иммунитета. Проведены исследования иммунологической эффективности моновакцин, дивакцин и ассоциированных вакцин против коклюша, дифтерии и столбняка (Кузнецова Л.С., 1960; Баева Е.А., 1972).

Разработаны научные основы ликвидации заболеваемости дифтерией (Хазанов М.И., 1968), рассмотрены иммунологические аспекты носительства *Corynebacterium diphtheriae* (Хисамутдинов А.Г., 1975). Выявлены эпидемиологические особенности скарлатины в СССР, оценена эффективность мероприятий в очагах, а также роль скарлатинозных реконвалесцентов при различных сроках выписки (Сухорукова Н.Л., 1959; Додонов В.Н., 1972).

Охарактеризованы природно-очаговые инфекции Казахской ССР (Киреев П.Г., 1965). Изучены особенности эпидемиологии и профилактики кишечных инфекций в Узбекской ССР (Аминзаде З.М., 1964; Пулатов Я.Г., 1965; Каримов З.К.; 1966, Юлдашев А.К., 1967; Бахрамова Р.Р., 1968; Кадыров А.М., 1970; Невский М.В., 1971).

Результаты научных исследований, проведённых многочисленными учениками Ивана Ивановича Ёлкина, позволили изучить современные проявления заболеваемости актуальными инфекционными болезнями, создать эффективную си-

стему эпидемиологического надзора и управления заболеваемостью.

На протяжении многих лет И.И. Ёлкин вёл большую редакционную работу, являясь членом научно-редакционного совета издательства «Медицина», главным редактором Министерства здравоохранения СССР, редактором журнала «Гигиена и санитария», соредактором отдела эпидемиологии «Большой медицинской энциклопедии».

С 1954 по 1982 г. Иван Иванович Ёлкин был главным редактором «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» — старейшего научно-практического периодического издания страны. Первый номер журнала вышел в 1924 г. под названием «Журнал микробиологии, патологии и инфекционных болезней».

С 1935 г. журнал стал называться «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии». В нём продолжали публиковаться научные работы по микробиологии и иммунологии, но чаще стали появляться статьи по эпидемиологии — обобщая опыт профилактики наиболее актуальных для того времени инфекций. С 1935 г. на страницах журнала публиковались исследования в области эпидемиологии сыпного тифа Л.В. Громашевского и соавт. После завершения экспедиций на Дальний Восток и Сибирь и изучения этиологии, клиники, эпидемиологии весенне-летнего (клещевого) энцефалита в журнале со статьями выступили А.А. Смородинцев, М.П. Чумаков, Д.В. Соловьев и др. О первых находках японского энцефалита на Дальнем Востоке сообщил А.А. Смородинцев.

Много внимания на страницах журнала было уделено профилактическим прививкам против оспы, дифтерии, туберкулёза, дизентерии, брюшного тифа, серопротекции кори, фагопрофилактике дизентерии.

Журнал продолжал выходить в годы Великой Отечественной войны. Уже в первый год войны в журнале были опубликованы статьи, посвящённые ускоренным методам диагностики, серотерапии, химиотерапии анаэробной инфекции ран. В годы войны были опубликованы работы С.П. Карпова, Л.М. Хатеневера и др., посвящённые эпидемиологии и диагностике туляремии, с которой приходилось встречаться действующим войскам Красной Армии. Наиболее яркими работами по проблеме профилактики туляремии являлись исследования Н.А. Гайского и Б.Я. Эльберта, которые завершились созданием живой противотуляремийной вакцины.

Крупным достижением науки военного времени стала разработка метода массового получения убитой вакцины против сыпного тифа. На эту тему в журнале были опубликованы статьи М.К. Кронтовской, М.М. Маевского и др.

Основное внимание журнал уделял проблеме острых инфекционных болезней, распростране-

нию которых как в действующей армии, так и среди мирного населения способствовали условия войны. Много статей было посвящено проблеме профилактики детских инфекций в условиях Великой Отечественной войны.

После окончания войны перед органами здравоохранения встала задача ликвидации эпидемических последствий войны. В журнале появились статьи И.И. Рогозина, А.И. Волкова, А.А. Часовникова, И.И. Ёлкина, Е.И. Смирнова, Т.Е. Болдырева и др., посвящённые борьбе с инфекционными болезнями.

Главными редакторами журнала с момента выпуска первого номера были Л.А. Тарасевич, Л.В. Громашевский, И.И. Рогозин, В.Д. Тимаков, И.И. Ёлкин.

С приходом нового главного редактора журнал стал выходить ежемесячно, объём его увеличился до 10 печатных листов. На страницах журнала развернулась дискуссия по теоретическим вопросам общей эпидемиологии. Она помогла отечественным эпидемиологам прийти к единому мнению по многим вопросам теории эпидемиологии. В ходе дискуссии с теоретическими статьями выступали Л.В. Громашевский, Е.И. Смирнов, Н.Р. Дядичев, И.И. Ёлкин, И.И. Рогозин, И.И. Шатров, Н.А. Хоменко и др.

Когда в 1960-е гг. перед органами здравоохранения встала задача по дальнейшему снижению заболеваемости и ликвидации отдельных инфекционных болезней, на страницах «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» развернулось широкое обсуждение путей и методов решения этих вопросов. С большими статьями на эту тему выступили Л.В. Громашевский, Ш.Д. Мошковский, И.И. Ёлкин, И.И. Рогозин, И.И. Шатров, П.Ф. Здродовский, В.М. Жданов и др.

На страницах журнала много внимания уделялось освещению опыта противоэпидемической работы санитарно-эпидемиологических станций, амбулаторно-поликлинических учреждений, отдельных специалистов. Широко обсуждались методы эпидемиологического анализа, медицинской статистики, применение ЭВМ в эпидемиологии. Об этом писали Е.П. Тамбовцев, И.С. Безденежных, И.И. Ёлкин, Б.Я. Тепляков, В.В. Бирюков, И.П. Ашмарин, М.Н. Ткачев, Ш.Г. Ханин и др.

Большое внимание уделяли теории иммунологии и научной разработке новых путей специфической профилактики Л.А. Зильбер, В.И. Иоффе, Г.В. Выгодчиков, А.А. Воробьев. С фундаментальными теоретическими трудами выступил П.Ф. Здродовский, обосновавший новые подходы к пониманию иммуногенеза.

В статьях А.А. Смородинцева, О.Г. Анджапаридзе, В.М. Болотовского, С.М. Тереховой, М.А. Барабаш и др. обсуждались вопросы создания и изучения эпидемиологической и иммунологической эффективности новых вакцин против кори. Широко

освещалась на страницах журнала вакцинация против коклюша (М.С. Захарова, А.А. Демина, Е.А. Баева и др.). В ряде статей были представлены особенности вакцинации против гриппа (А.А. Смородинцев, В.Д. Соловьев, А.Н. Слепушкин, М.И. Блинова, В.М. Жданов, О.В. Бароян, Т.К. Бобылева и др.).

Появились сообщения о результатах контролируемых эпидемиологических исследований по изучению новых профилактических препаратов, в частности, статьи, посвящённые усовершенствованию вакцин против брюшного тифа (И.И. Шатров, М.П. Покровская, Е.В. Чернохвостова, В.Д. Геккер, Н.И. Ковалева, А.Н. Мешалова и др.). Возродился интерес к проблеме специфической профилактики дизентерии на базе живых вакцин (В.В. Сергеев и др.).

Большое внимание уделялось и другим профилактическим препаратам. Например, опубликовано много статей о применении гамма-глобулина для профилактики инфекционного гепатита, других инфекционных болезней (Н.В. Холчев, С.С. Спотаренко, Т.С. Подседловский, З.К. Каримов, И.И. Шатрова и др.).

По вопросам микробиологии опубликованы крупные теоретические статьи по изменчивости и генетике бактерий и вирусов (В.Д. Тимаков, В.Г. Петровская, Д.Г. Кудлай, А.Г. Скавронская, А.П. Петров), вышла в свет серия работ, посвящённых изучению L-форм бактерий (В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган, В.С. Левашев и др.).

Большое внимание уделялось публикации материалов по этиологии, патогенезу, эпидемиологии и профилактике ряда инфекционных заболеваний. Значительное число статей было посвящено вопросам дезинфекции и дезинсекции (В.И. Вашков и др.).

Серия работ была посвящена разработке теоретических основ эпидемиологической географии и учению о природной очаговости, а также эпидемиологии и профилактике природно-очаговых болезней (Е.И. Павловский, П.А. Петрищева, А.Я. Алымов, И.И. Ёлкин, В.К. Яшкуль, Н.Г. Олсуфьев, Ю.А. Мясников, В.В. Ананьин, С.М. Кулагин, Г.П. Соменов, С.П. Карпов, Е.П. Ковалева, И.В. Тарасевич, Н.П. Наумов, В.И. Терских, В.С. Киктенко и др.).

Большое внимание на страницах журнала уделялось вопросам подготовки и усовершенствования кадров. Так, в 1968 г. появилась статья, в которой была обоснована целесообразность введения специализации на санитарно-гигиенических факультетах, иными словами, предлагалось готовить не санитарного врача вообще, а врача-эпидемиолога, микробиолога, специалиста по коммунальной гигиене и т.д. В разное время публиковались также статьи о совершенствовании методов преподавания и оптимизации учебного процесса. Вышло немало работ, посвящённых истории эпидемиологии, микробиологии и иммунологии, а также становлению

и развитию системы борьбы и профилактики инфекционных болезней в СССР.

К работе «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунологии» были привлечены сотни российских и зарубежных специалистов. Редакционная коллегия пользовалась услугами более 200 рецензентов. Журнал стал зеркалом научной жизни, выступал проводником научных знаний и способствовал принятию практическим здравоохранением научно обоснованных решений.

Иван Иванович Ёлкин был известным учёным, обладал большим опытом практической работы, поэтому неоднократно выезжал в зарубежные командировки: в 1951 г. — в КНДР для оказания помощи населению в борьбе с эпидемиями, в 1959 г. — в Ирак для консультативной работы по вопросам здравоохранения. В 1960 г. он представлял советскую науку на Международном эпидемиологическом симпозиуме в Чехословакии. Выезжал для чтения лекций в Прагу и Братиславу, неоднократно выступал с лекциями в Берлинском, Йенском, Веймарском и Лейпцигском университетах. Участвовал в Международном симпозиуме по преподаванию эпидемиологии в Брюсселе.

Информация об авторах

Брико Николай Иванович[✉] — д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана, зав. каф. эпидемиологии и доказательной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, nbrico@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6446-2744>

Соколова Татьяна Васильевна — к.м.н., доцент каф. эпидемиологии и доказательной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4516-7918>

Участие авторов: *Брико Н.И., Соколова Т.В.* — концепция, написание текста и редактирование. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.08.2023;
принята к публикации 12.10.2023;
опубликована 28.02.2024

И.И. Ёлкин был человеком с активной гражданской позицией. В 1928 г. он стал членом ВКП(б), много времени уделял общественной работе. Во время работы в Горьком Иван Иванович был председателем Научно-медицинской ассоциации, избирался членом горсовета. Много лет являлся членом Пленума ВАК. В течение 5 лет был председателем правления Всесоюзного общества эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов. Избирался заместителем председателя Общества советско-иракской дружбы, являлся членом Московского комитета защиты мира.

Заслуги И.И. Ёлкина перед государством отмечены правительственными наградами, он награждён орденами Отечественной войны I и II степени, орденом Красной Звезды, орденом Трудового Красного Знамени, Знаком Почёта и 6 медалями. Президиум Верховного Совета Узбекской ССР присвоил ему почётное звание «Заслуженный деятель науки».

Крупный учёный и общественный деятель, мудрый наставник и педагог, который обладал редким даром угадывать будущую личность и раскрывать её потенциал, Иван Иванович Ёлкин оставил яркий след в истории отечественной эпидемиологии.

Information about the authors

Nikolay I. Briko[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, Full Member of RAS, Director, F. Erismann Institute of Public Health, Head, Department of epidemiology and evidence-based medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, nbrico@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6446-2744>

Tatiana V. Sokolova — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of epidemiology and evidence-based medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4516-7918>

Author contribution: *Briko N.I., Sokolova T.V.* — research concept, writing text and editing. 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 09.08.2023;
accepted for publication 12.10.2023;
published 28.02.2024

ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>



Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai during the COVID-19 pandemic

Anna Yu. Popova¹, Mikhail Yu. Shchelkanov^{2,3}, Natalia V. Krylova^{2,3}, Alexey A. Belik², Lyubov M. Semeikina^{2,4}, Tatyana S. Zaporozhets², Vyacheslav Yu. Smolenskiy¹, Elena V. Persianova², Marina N. Prosyannikova⁴, Yuriy A. Belov^{2,3}, Olga V. Iunikhina^{2,3}, Anastasiya B. Pott², Tatyana F. Khomichuk⁴, Anna I. Simakova⁵, Svetlana A. Abramova², Olga B. Romanova⁴, Tatyana N. Detkovskaya⁶, Sergey P. Kryzhanovskiy⁷, **Natalia N. Besednova**^{2,7}

¹Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, Moscow, Russia;

²G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia;

³Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia;

⁴Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai;

⁵Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia;

⁶Office of the Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare for the Primorsky Krai, Vladivostok, Russia;

⁷Medical Association of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract

Introduction. The COVID-19 pandemic, etiologically related to SARS-CoV-2, was the longest-lasting pandemic for an acute respiratory disease and had a significant impact on demography, economics and politics globally. Experiences with this pandemic are significant for the sustainable development of human society. A detailed analysis of these experiences in epidemic control should include details of the pathogen evolution down to the regional level.

The aim of the study was to establish the regularities of the COVID-19 epidemic process in connection with the change of the pathogen genetic variants on the territory of Primorsky Krai.

Materials and methods. A retrospective epidemiological analysis of COVID-19 incidence and dynamics of circulation of SARS-CoV-2 genetic variants during the pandemic of this disease (11.03.2020–05.05.2023) in Primorsky Krai was carried out. Data was gathered from the Department of Rospotrebnadzor in Primorsky Krai, the Centre of Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai, as well as the G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Russian Federation and Russian Platform for Aggregation of Information on Virus Genomes (VGARus). In particular, 1055 nucleotide sequences of full-length SARS-CoV-2 genomes from Primorsky Krai, among which 553 were sequenced at the G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology were included in analysis.

Results. When analyzing the epidemic dynamics of COVID-19 in Primorsky Krai (2020–2023), 7 rises in incidence with different clinical and epidemiological symptoms depending on the genetic variants of the pathogen were identified. At the beginning of the pandemic in Primorsky Krai, as well as throughout Russia, Wuhan-like variants of SARS-CoV-2 were predominant, though later, Delta and Omicron genetic variants were in the majority. By the end of April — beginning of May 2023, the proportion of Omicron sub-variants (XBB.1.9.2 and XBB.1.16) in Primorsky Krai was higher than the Russian average and comparable to that in neighboring countries (Republic of Korea and Japan).

Conclusion. Due to the ongoing evolution of SARS-CoV-2, the possibility of the emergence of new pathogens, the peculiarities of the geographical location as well as political and economic importance of Primorsky Krai, it is necessary to consistently improve regional capabilities for operational molecular virological monitoring.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; Primorsky Krai; disease incidence; whole genome sequencing; genotypes

Ethical approval. The study was conducted with the voluntary informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol no. 2 of November 11, 2021).

Funding source. The work was financed under the state assignment of the G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology under the research project "Molecular-genetic and phenotypic properties of respiratory

pathogens. Search for effective compounds from terrestrial and marine biota of the Far East for the development of means of prevention and treatment" (reg. № 122041800135-3) and the Federal Project "Sanitary Shield — Safety for Health (prevention, detection, response)" in the section of replenishment of the "National Electronic Catalogue of Pathogenic Microorganisms and Biotoxins".

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

For citation: Popova A.Yu., Shchelkanov M.Yu., Krylova Natalia V., Belik A.A., Semeikina L.M., Zaporozhets T.S., Smolenskiy V.Yu., Persianova E.V., Prosyannikova M.N., Belov Yu.A., Iunikhina O.V., Pott A.B., Khomichuk T.F., Simakova A.I., Abramova S.A., Romanova O.B., Detkovskaya T.N., Kryzhanovskiy S.P., Besednova N.N. Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai during the COVID-19 pandemic. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(1):19–35.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>

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

Оригинальное исследование

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>

Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19

Попова А.Ю.¹, Щелканов М.Ю.^{2,3✉}, Крылова Н.В.^{2,3}, Белик А.А.², Семейкина Л.М.^{2,4}, Запорожец Т.С.², Смоленский В.Ю.¹, Персиянова Е.В.², Просянникова М.Н.⁴, Белов Ю.А.^{2,3}, Иунихина О.В.^{2,3}, Потт А.Б.², Хомичук Т.Ф.⁴, Симакова А.И.⁵, Абрамова С.А.², Романова О.Б.⁴, Детковская Т.Н.⁶, Крыжановский С.П.⁷, **Беседнова Н.Н.**^{2,7}

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия;

³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия;

⁴Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия;

⁵Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия;

⁶Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в Приморском крае, Владивосток, Россия;

⁷Медицинское объединение Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Аннотация

Введение. Пандемия COVID-19, этиологически связанная с SARS-CoV-2, стала самой продолжительной для острого респираторного заболевания и оказала заметное воздействие на демографию, экономику и политику в мировом масштабе. Уроки этой пандемии имеют важное значение для устойчивого развития человеческого общества. Подробный анализ приобретённого опыта по контролю эпидемического процесса должен включать детализацию эволюции возбудителя вплоть до регионального уровня.

Цель исследования — установление закономерностей эпидемического процесса COVID-19 в связи со сменой геновариантов возбудителя на территории Приморского края.

Материалы и методы. Проведён ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости COVID-19 и динамики циркуляции геновариантов SARS-CoV-2 в период пандемии этого заболевания (11.03.2020–05.05.2023) на территории Приморского края. Использованы данные Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора и Российской платформы агрегации информации о геномах вирусов (VGARus), в частности 1055 нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов SARS-CoV-2 из Приморского края, среди которых 553 были секвенированы в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

Результаты. При анализе эпидемической динамики COVID-19 в Приморском крае (2020–2023 гг.) выделены 7 подъёмов заболеваемости с различными клинико-эпидемиологическими проявлениями в зависимости от геновариантов возбудителя. В начале пандемии в Приморском крае, как и по всей России, доминировали Ухань-подобные варианты SARS-CoV-2, в дальнейшем — геноварианты Delta и Omicron. К концу апреля – началу мая 2023 г. доля субвариантов Omicron (ХВВ.1.9.2 и ХВВ.1.16) в Приморском крае была выше, чем в среднем по России, и сопоставима с таковой в сопредельных странах (Республика Корея и Япония).

Заключение. В связи с продолжающейся эволюцией SARS-CoV-2, возможностью появления новых патогенов, особенностями географического расположения и политико-экономического значения Приморского

края необходимо последовательно совершенствовать региональные возможности оперативного молекулярно-вирусологического мониторинга.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; COVID-19; Приморский край; заболеваемость; полногеномное секвенирование; генотипы

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (протокол № 2 от 16.11.2021).

Источник финансирования. Финансирование работы осуществлялось по государственному заданию НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова в рамках НИР «Молекулярно-генетические и фенотипические свойства возбудителей респираторных инфекций. Поиск эффективных соединений из наземной и морской биоты Дальнего Востока для разработки средств профилактики и лечения» (рег. № 122041800135-3) и Федерального проекта «Санитарный щит — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» в разделе пополнения «Национального электронного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов».

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

Для цитирования: Попова А.Ю., Щелканов М.Ю., Крылова Н.В., Белик А.А., Семейкина Л.М., Запорожец Т.С., Смоленский В.Ю., Персиянова Е.В., Просяникова М.Н., Белов Ю.А., Иунихина О.В., Потт А.Б., Хомичук Т.Ф., Симакова А.И., Абрамова С.А., Романова О.Б., Детковская Т.Н., Крыжановский С.П., Беседнова Н.Н. Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):19–35.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>

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

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is etiologically related to Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2; Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, subgenus *Sarbecovirus*) [1, 2] and resulted from the pathogen crossing the interspecies barrier and entering the human population from bat populations (*Chiroptera*, *Microchiroptera*) [3, 4]. COVID-19 caused the longest (11.03.2020–05.05.2023, or 1150 days), largest (over 750 million confirmed cases) and one of the deadliest (about 6 million deaths) acute respiratory disease pandemic in human history [3, 5]. The COVID-19 pandemic was the first to be associated with a coronavirus of bats (*Chiroptera*) [1, 6], the second largest mammalian group after rodents, with a number of unique evolutionary features [7–9], the epidemiological significance of which became clear only in the early 21st century after the epidemics caused by SARS coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, subgenus *Sarbecovirus*) [1, 10] and Middle East respiratory syndrome (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, subgenus *Merbecovirus*) [11, 12].

The COVID-19 pandemic stimulated the widespread introduction of molecular genetic [13, 14] and information [15, 16] technologies into the practice of anti-epidemic measures. With the degradation of broad international relations in the early 2020s, exacerbated by the pandemic, and the declining authority of international organizations, including the World Health Organization (WHO), the Russian Federation was forced to deploy its own national molecular genetic data platform, the Virus genome aggregator of Russia (VGARus), developed by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor). VGARus was put into operation at the Central Research Institute of Epidemio-

logy of Rospotrebnadzor by the Order No. 448 of the Russian Government from 23.03.2021. By the end of 2023, more than 150 organizations were registered in the system, carrying out its replenishment; the database contains more than 300 thousand nucleotide sequences of SARS-CoV-2, more than half of which are full-length viral genomes [14, 17]. Thus, unlike even the last influenza A (H1N1 pdm09) (Articulavirales: Orthomyxoviridae, *Alphainfluenzavirus*) pandemic (2009–2010) [18], when molecular genetic methods were actively used to monitor the infectious process, the COVID-19 pandemic was the first global epidemic process that was characterized in detail using real-time whole-genome sequencing data (at least in developed countries) [14, 17, 19].

Russia, being the largest territory in the world, has an enormous regional diversity of natural, climatic and socio-demographic conditions, which should be taken into account in the process of epidemiological analysis of infectious disease dynamics. For example, Primorsky Krai (PK), located in the south of the Russian Far East (practically at the latitude of the Crimean Peninsula), is characterized by a unique monsoon temperate climate formed by a latitudinal climatic anomaly due to the cold Primorsky Current flowing through from the Tatar Strait. The PK provides convenient access via non-freezing ports (Vladivostok, Vostochny, Zarubino, Nakhodka, Posyet) to the dynamically developing Asia-Pacific region and is traditionally closely connected with the north-eastern provinces of the People's Republic of China by all means of transport. The administrative center of the PK, Vladivostok, being the capital of the Far Eastern Federal District, is well recognized both in Russia and abroad due to its free port status and the presence of the Far Eastern Federal University, one of the largest educational facilities in the Asian part of Russia.

The aim of this study is to analyze the regularities of the COVID-19 epidemic process development in the PK territory during the pandemic period of this disease with the help of molecular genetics (2020–2023).

Materials and methods

Nasopharyngeal swabs for PCR testing and obtaining viral strains were collected from people living in the PK territory. Biological material was collected by qualified personnel who had undergone preliminary training and regular skills testing on rhinolaryngological simulators [20, 21]. The study was conducted with the voluntary informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 2 of November 11, 2021).

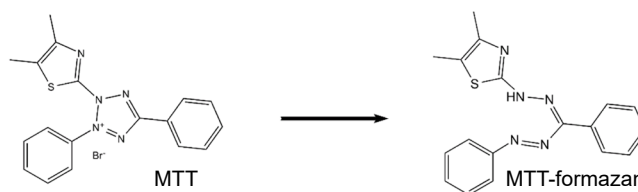
SARS-CoV-2 RNA was detected by reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR): RNA isolation was performed manually using the M-Sorb-NK reagent complex (Syntol) or (in case of large amounts of samples) at the AutoPure 96 automatic station (Hangzhou Allsheng Instruments Co.), RT-PCR-SARS-CoV-2 reagent kit (Syntol). Positive samples intended for subsequent use for research purposes were stored at -20°C while maintaining the cold chain.

Sequencing of full-length SARS-CoV-2 genome was performed for positive samples with threshold cycle in primary PCR testing $C_t \leq 25$ on the Nanopore technology platform [22, 23] according to ARTIC SARS-CoV-2 v3 protocol: reverse transcription was performed using the Midnight RT-PCR Expansion kit; amplicons were obtained and coded using 29 pairs of overlapping primers and the Rapid Barcoding Kit 96 (SQK-RBK110. 96); cDNA purification was performed on AMPure XP beads magnetic particles; the resulting genomic libraries were sequenced on a MinION instrument using FLO-MIN106 R9.4.1 cells (Oxford Nanopore Technologies). The obtained data in FAST5 format (the MinKNOW software package was converted to FASTQc format using the Guppy v. 6.3.8 program). SARS-CoV-2 genomes were assembled in FASTA format by alignment with reference sequences from VGARus using the Epi2me v. 22 software package and the ARTIC v. 1 module. To assess the quality of the assembled sequences and genome distribution among lineages, the Nextclade and Pangolin COVID-19 Lineage Assigner v. 4.3 services were used. Sequences in which the number of unrecognized or ambiguous nucleotides was more than 10% of the full genome sequence of SARS-CoV-2 were excluded from the sample for analysis.

Phylogenetic analysis of nucleotide sequences was performed after multiple alignment using MAFFT v. 7.475 by the "neighbor joining" method [24] using the MEGA v. 11.0.13 software package at the bootstrap support level of 1000 repetitions. Visualization of the obtained data was performed using the iTOL v. 6 service.

Isolation of SARS-CoV-2 strains was performed from qPCR-positive samples of nasopharyngeal washings, clarified by low-speed centrifugation and filtered through Millex (Merck) nozzles with a pore diameter of $0.22\ \mu\text{m}$, on the Vero E6 cell line model (kidneys of the African green monkey), which was cultured in plastic tubes (Nunc) with a slanted bottom of $5.5\ \text{cm}^2$ in DMEM medium (BioloT) supplemented with 1% fetal calf serum (PanEco), 100 U/ml gentamicin at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 [25, 26]. The efficiency of virus isolation was evaluated by decreasing the threshold cycle of PCR in 3 consecutive passages. On the 5th day after infection, the culture fluid was taken for RT-qPCR (after the 3rd passage, we additionally determined Ig of the 50% tissue culture infectious dose (lg TCID_{50}) using the MTT test).

The MTT assay was used to assess the survival of Vero E6 cells under the influence of different dilutions of the virus when evaluating the infectious titer of SARS-CoV-2 strains after the 3rd passage. The essence of this method is the ability of viable cells to convert the highly soluble yellow bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) into insoluble intracellular crystals of (E, Z)-5(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan (MTT-formazan) under the action of intracellular dehydrogenases [27, 28]:



On the 5th day after infection, $20\ \mu\text{l}$ of 5 mg/ml MTT solution (Sigma-Aldrich) was added to the wells with cells in a 96-well plate (Merck); incubated at 37°C in an atmosphere with 5% CO_2 for 2 hours; after removal of culture media, $150\ \mu\text{l}$ of isopropyl alcohol acidified with 0.4 M HCl was added to the wells; the optical density in the well was determined at 540 nm (near the absorption maximum of MTT-formazan) with subtraction of the background value at 620 nm using a tablet reader (Labsystems). The cytopathogenicity level (CPL) of the strain in a particular dilution was calculated according to the following formula:

$$\text{CPL} = \left(1 - \frac{D_v}{D_0}\right) \times 100\%,$$

where D_v — optical density of the infected sample; D_0 — optical density of uninfected cell culture.

The infectious titre of the strain was defined as the limiting dilution of the initial virus-containing liquid recorded in the experiment, for which $\text{CPL} > 0$ (inequality to zero was assessed by Student's t-test at a significance level of $p = 95\%$ and 8-fold repetitions of each dilution of the virus-containing liquid).

Epidemiological analysis of COVID-19 incidence in PK from 20.04.2020 to 30.06.2023 was based on data from the Department of Rospotrebnadzor for Primorsky Krai, the Centre for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai¹, in Russia — on data from the official website of Rospotrebnadzor² and the Russian information portal Stopcoronavirus³. Information on the distribution of genetic variants of SARS-CoV-2 in Russia was used from the review and analytical work [17, 19] and the Russian database VGARus, in Eastern Asian countries – from the international database GISAID⁴.

Statistical processing of data was carried out using the following functions from the MS Excel 2010 software package: sample size (n); arithmetic mean (M); standard error of mean (m); median (Me); lower (25%) quartile (LQ); upper (75%) quartile (UQ); interquartile range (LQ-UQ). The normality of distribution of quantitative signs was tested using the Shapiro–Wilk W -test; Student's t -test (at the significance level of the alternative hypothesis $p = 0.05$); Mann–Whitney U -test [29, 30].

The method of principal components as a way to find a subspace of lower dimensionality, in projection on which the initial data have the smallest spread of quadratic deviations [31, 32], was applied using the software packages "Statistica v. 7.0" ("StatSoft Inc.") and "Mathworks Matlab R2007b" software packages.

Results

Indication of SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal washings during the COVID 19 pandemic in PK territory was carried out in 24 laboratories (including 5 private laboratories): 3,007,009 RT-qPCR tests were performed, of which 399,821 (13.3%) were positive⁵. The obtained information was integrated for operational analysis in the epidemiological units of the Centre for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai and the Primorsky Krai Department of Rospotrebnadzor.

The full-genome nucleotide sequences of SARS-CoV-2 obtained from samples of biological material collected on the territory of the PK during the COVID-19 pandemic are presented in **Table 1**. In addition to 553 genomes sequenced at the G.P. Somov Research In-

stitute of Epidemiology and Microbiology within the framework of the Federal Project Sanitary Shield of the Country — Safety for Health, another 502 genomes were sequenced in other scientific institutions, to which RT-qPCR-positive samples from the Center of Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai were sent in accordance with the Order of Rospotrebnadzor⁶.

The results of phylogenetic analysis of full-length SARS-CoV-2 genomes from the PK territory (Table 1), shown in Fig. 1, *a*, indicate differentiation into genetic variants according to the Pango (Fig. 1, *b*) and WHO (Fig. 1, *c*) classifications.

The epidemic dynamics of COVID-19 in connection with the change of SARS-CoV-2 genetic variants on the territory of the PK (2020–2023) is presented in **Fig. 2** and **Table 2**: as in Russia as a whole, the rise in COVID-19 incidence during the pandemic period of this disease (11.03.2020–05.05.2023), which began with large megacities [17, 19], had a pronounced wave-like character with 7 epidemic periods.

In PK, the first case of COVID-19 was registered on 21.03.2020 (a 30-year-old woman, Russian citizen, living in Vladivostok, who returned on 15.03.2020 from a business trip to Cancun, Mexico), and as of 05.05.2023, 217,196 cases of this disease were documented.

Generally speaking, the dynamics of the epidemic process in the region corresponded to the average in Russia (Fig. 2, Table 2), but with some delay (about 2 weeks) compared to the central regions of the country (similarly to the spread of pandemic influenza A (H1N1 pdm09) [18]). The first rise in COVID-19 incidence in PK was characterized by a slow increase over 13 weeks with a peak at week 29. In Russia, this process developed more rapidly – the peak incidence was registered already in 5 weeks from the beginning of the upsurge with a local maximum in 19 weeks. The slower development of epidemic growth in PK was primarily due to the introduction of strict regime-restrictive measures. During this period in Russia, mainly Wuhan-like variants of the pathogen were isolated from COVID-19 patients: B.1.1 (62.0%), B.1.1.317 (3.3%). In PK, most of the virus genetic variants also belonged to the B.1.1 (26%) and B.1.1.x (B.1.1.317 and B.1.1.277.2) lineages — 74% (Fig. 2, **Table 3**).

During wave II, the increase in incidence in both PK and Russia was slower — 11 and 17 weeks, with peaks at weeks 50 and 52, respectively. The proportion of B.1.1 in Russia decreased to 33.7%, while the proportion of B.1.1.317 and B.1.1.523 increased to 21.3%; new genetic variants appeared: Alpha (B.1.1.7) — 7.2% and Delta (B.1.617.2) — 1.6%. In PK, the B.1.1 genetic lineage dominated during this period (68.4%);

¹ Rospotrebnadzor reporting form No. 970 "Information on cases of persons with suspected coronavirus infection", report No. 1076 "Summary report on COVID-19 cases in the regions".

² URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/epid.php

³ URL: <https://стопкоронавирус.рф/>

⁴ URL: <https://gisaid.org>

⁵ The number of RT-qPCR-positive samples should not be associated with the number of patients with COVID 19: in 2020, patients were examined an average of 3.6 times, as at that time patients were discharged after a double negative result, which was not achieved the first time; in 2021, discharge started to be performed after a single negative result and later on upon recovery.

⁶ Order of Rospotrebnadzor of 19.02.2021 № 56 "On improvement of molecular genetic monitoring for strains of the causative agent of a new coronavirus infection".

Table 1. Data on full-genome sequences of SARS-CoV-2 detected in the territory of Primorsky Krai (2020–2023) in the VGARus database

Year	G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (Vladivostok)	State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (Novosibirsk)	Institute of Influenza (St.-Petersburg)	Total
2020	173	2	23	198
2021	90	11	1	102
2022	105	158	306	569
2023	185	0	1	186
Total	553	171	331	1055

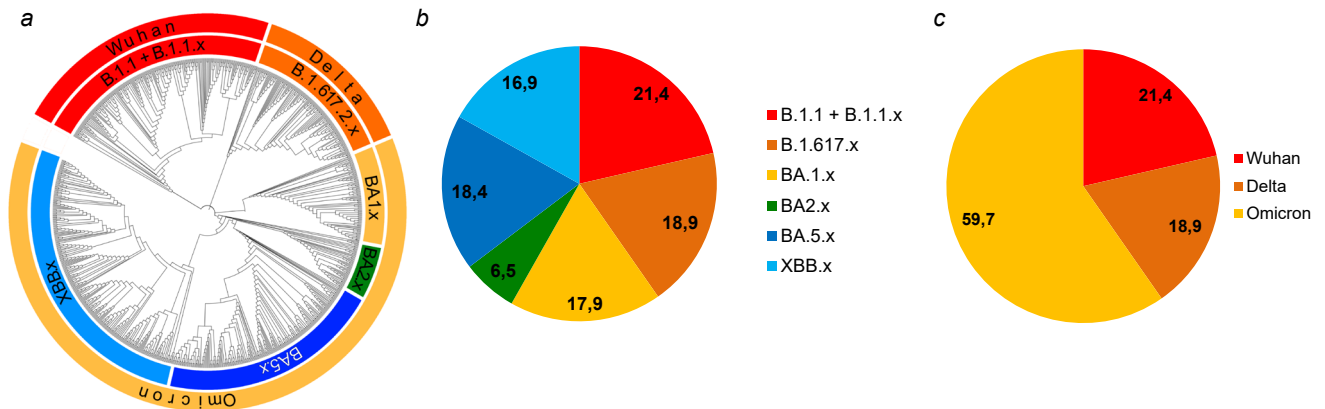


Fig. 1. Genotyping of 804 full-genome SARS-CoV-2 nucleotide sequences identified in Primorsky Krai (2020–2023).
 a — phylogenetic tree; b — distribution according to Pango genetic lines; c — distributions according to WHO genovariants.

other gene variants B.1.1.x (primarily B.1.1.317 and B.1.1.277.2) together accounted for 31.6%. In 2021, the periods of rises in incidence were shorter but characterized by a more intensive development of the epidemic process. At that time, III and IV rises of incidence rates were registered in PK with peaks at 27 and 48 weeks, respectively; in Russia, the III rise lasted on average

4 months with the maximum incidence rate at week 29, the IV rise — from September to January 2021. During this period, the process of changing the biological properties of the pathogen was actively underway: the percentage of the Delta genetic variant (B.1.617.2.x) increased to 93–97%, practically displacing all previously circulating lineages.

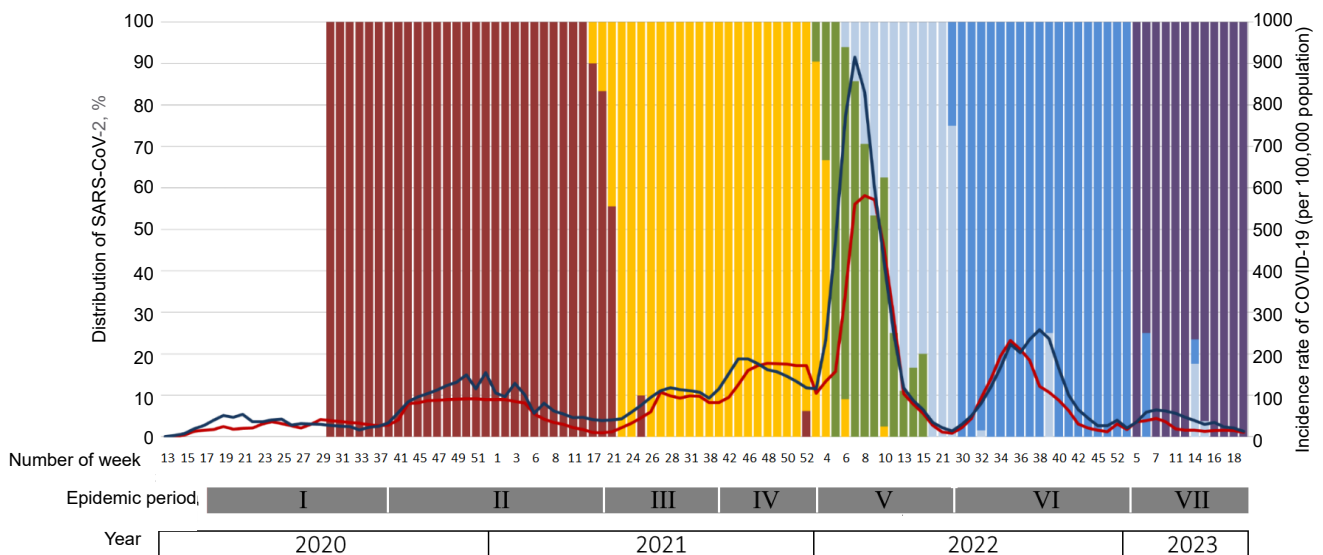


Fig. 2. Incidence of COVID-19 and genetic diversity of SARS-CoV-2 on the territory of Primorsky Krai (2020–2023).
 Left ordinate: B.1.1 + B.1.1.x; B.1.617.2.x; BA.1.x; BA.2.x; BA.5.x; XBB.x.
 Right ordinate: in Primorsky Krai; in a whole Russia.

Table 2. Characteristics of epidemic dynamics of COVID-19 in Primorsky Krai in comparison with a whole Russian Federation (2020–2023)

Period	Territory	Dates of epidemic periods						Incidence (per 100 000 population)										Clinical form		
		beginning		end		duration, weeks	incidence in the beginning of the period	incidence in the end of the period	maximum	M	m	Me	LQ	UQ	total number of incidences	severe, %	average severity, %	mild and asymptomatic, %		
		date	number of a week	date	number of a week															
I	PK	20.04.2020	17	20.09.2020	38	22	12,83	2,65	41,8	27,6	1,7	28,2	21,1	32,6	606,6	2,1	31,5	66,4		
	RF	30.03.2020	13	30.08.2020	36	22	19,6	25,6	54,5	29,8	3,0	29,8	25,1	38,8	654,9	4,5	47,7	47,8		
II	PK	21.09.2020	39	09.05.2021	18	33	28,7	9,5	91,6	54,0	5,4	54,9	24,2	87,2	1783,4	5,8	32,2	62		
	RF	31.08.2020	36	09.05.2021	18	36	28,1	41,3	154,9	73,4	6,2	60,6	42,5	101,7	2641,9	3,1	41,6	55,3		
III	PK	10.05.2021	19	03.10.2021	39	21	11,8	82,6	107,7	67,4	7,4	83,7	32,6	93,5	1415,9	3,1	35,6	61,3		
	RF	10.05.2021	19	12.09.2021	37	18	39	101,6	119,2	83,6	7,0	93,5	47,6	110,3	1504,3	2,6	41,1	56,3		
IV	PK	04.10.2021	40	09.01.2022	1	14	86,67	100,7	177,1	142,9	9,3	157,7	109,8	171,8	2001,1	3,0	36,5	60,5		
	RF	13.09.2021	37	09.01.2022	1	17	115,7	95,5	191,8	141,8	8,3	145,5	115,7	172,8	2411,1	2,2	40,9	56,8		
V	PK	10.01.2022	2	18.07.2022	29	27	104,8	8,7	581,5	144,2	35,8	56,9	11,1	149,6	3893,5	1,3	29,8	68,9		
	RF	10.01.2022	2	18.07.2022	29	27	76,5	15,6	915,1	201,3	52,2	65,8	21,5	240,6	5435,3	0,4	33,0	66,6		
VI	PK	19.07.2022	29	09.01.2023	2	25	10,8	20,4	232,2	69,9	14,0	30,7	18,3	107,3	1747,7	0	12,1	87,9		
	RF	19.07.2022	26	09.01.2023	2	25	20,3	18,0	258	91,8	16,2	44,9	29,9	164,9	2296	–	–	–		
VII	PK	10.01.2023	2	25.06.2023	25	23	14,3	3,04	44,4	20,1	2,5	16,1	12,7	28,7	482,2	0	25,1	74,9		
	RF	10.01.2023	2	04.06.2023	22	20	15,2	8,8	64,9	36,2	3,9	34,4	21,3	54,7	767,1	–	–	–		

Note. PK — Primorsky Krai; RF — Russian Federation; “–” — no data.

Table 3. Distribution of SARS-CoV-2 genetic variants by COVID-19 pandemic periods on the territory of Primorsky Krai and a whole Russian Federation (2020–2023).

Period	Territory	Number of samples	Genovariants, %							not found in PK
			Wuhan	Alpha	Delta	Omicron				
			B.1.1 + B.1.1.x	B.1.1.7.x	B.1.617.2.x	BA.1.x	BA.2.x	BA.5.x	XBB.x	
I	PK	23	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	RF	1701	65,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,7
II	PK	201	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	RF	7417	55,0	7,2	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	36,2
III	PK	30	3,3	0,0	96,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	RF	10,602	5,1	2,5	89,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8
IV	PK	46	2,2	0,0	97,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	RF	23,315	0,1	0,0	93,5	6,1	0,0	0,0	0,0	0,3
V	PK	368	0,0	0,0	33,4	48,9	17,7	0,0	0,0	0,0
	RF	24,416	0,1	0,0	11,4	38,9	42,5	6,2	0,0	0,9
VI	PK	201	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	98,0	0,0	0,0
	RF	28,300	0,0	0,0	0,0	2,1	11,4	85,7	0,7	0,1
VII	PK	130	0,0	0,0	0,9	0,0	2,7	1,1	96,2	0,0
	RF	4928	0,0	0,0	0,0	1,5	0,3	35,9	62,3	0,0

Note. PK — Primorsky Krai; RF — Russian Federation.

The fifth rise in incidence in Russia as a whole and in PK was characterized by a sharp increase — the peak of incidence was reached 4 and 5 weeks after the beginning of the rise. The incidence rates during this period were significantly ($p < 0.05$) higher than in the previous periods. This increase was due to the combined circulation of the outgoing Delta variant (B.1.617.2.x) and the first two lineages of the Omicron variant (BA.1.x and BA.2.x). By the end of Period V, the dominance of the Omicron variant was established worldwide. Omicron BA.5.x sub-lineages, the percentage of which increased up to 90%, caused the VI upsurge of disease incidence in different regions of Russia. At the same time, both in PK and in Russia as a whole, the course of the epidemic process differed from the previous period by a lower intensity and speed of reaching peak indices. During the VII period there was a further decrease in the intensity of the epidemic process. The maximum value of the peak incidence rate on average in Russia was registered in the 8th week, in PK — in the 9th week from the beginning of the massive increase. During this period, the diversity of Omicron sub-variants increased significantly, one of them (XBB) spread rapidly around the world [33]. By the end of January 2023, XBB.x sub-variants prevailed in Russia as a whole as well as in PK, and their percentage in the structure of Omicron sub-variants increased to 62.3 and 92.8%, respectively.

When analyzing the clinical symptoms of COVID-19 in PK, much like in Russia as a whole, infections of mild (68.4 and 54.2%, respectively) and moderate (29.3 and 42.7%) severity prevailed. The percentage of severe forms was 2.3 and 3.1%, respectively. The first wave was characterized by a high proportion of pneumonias (20.9%) and asymptomatic forms (30.3%), the proportion of severe forms was 2.1% (Table 2). As the epidemic process developed in wave II, the highest proportion of severe forms of the disease (5.8%) was observed over the entire observation period, the proportion of non-nosocomial pneumonias was 17.7%. During the subsequent periods, the proportion of non-nosocomial pneumonias gradually decreased from 16.2% in wave III to 1.9% in wave VI. The percentage of severe forms of pneumonia also decreased from 3.1% to 0. It should be noted that the percentage of moderately severe forms of COVID-19 course was distributed unevenly over the periods of the upswing: it increased from I to III period (from 31.5 to 36.5%), decreased to 12.1% in VI period and increased again to 25.1% in VII period.

In epidemic period VII (May 2023), the XBB.x variant, first registered on 31.01.2023 (XBB.1.14 lineage), prevailed in PK, by the end of March — XBB.1.5.24 lineage, a subspecies of variant XBB.1.5 (Kraken), by 05.05.2023 the XBB.1.9.1 (Hyperion) variant became dominant (Fig. 3). It is particularly important to note

Distribution of SARS-CoV-2 variants, %

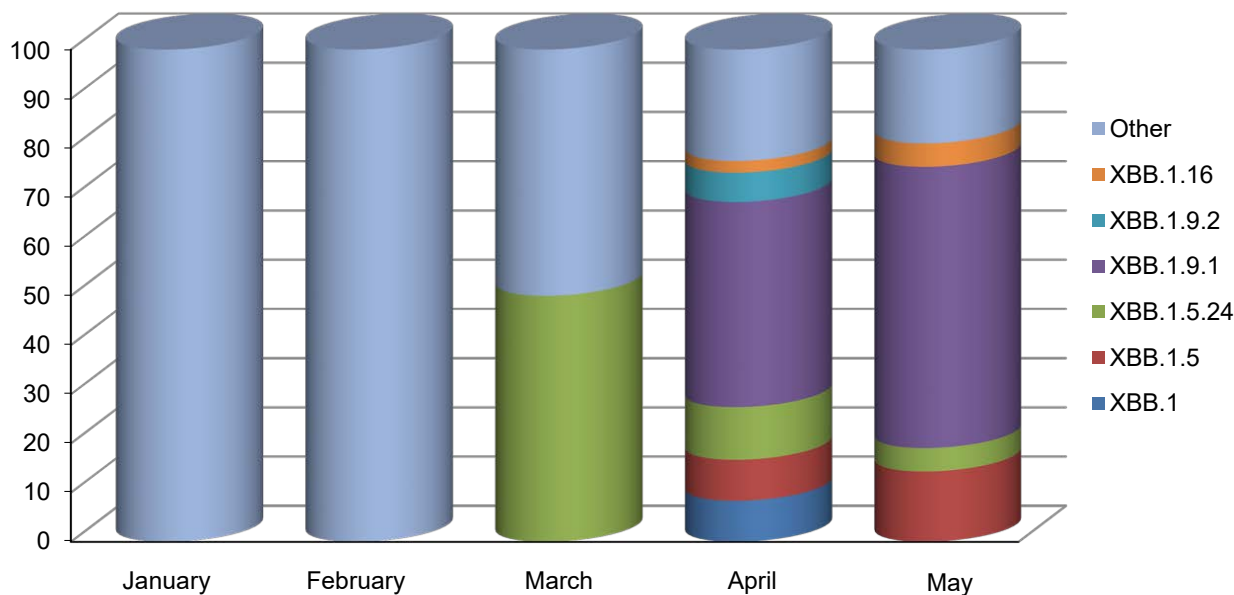


Fig. 3. Genetic diversity of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai from January to May 2023.

the high proportion of the XBB.1.5.24 (9% in PK and 6% in Russia as a whole) and XBB.1.9.1 (45 and 51%, respectively) variants, which contrasts sharply with the genetic landscape of SARS-CoV-2 strains in the neighboring countries of South-East Asia (Fig. 4). This pattern may be a consequence of the timely introduction of strict restrictive measures in Russia, including the

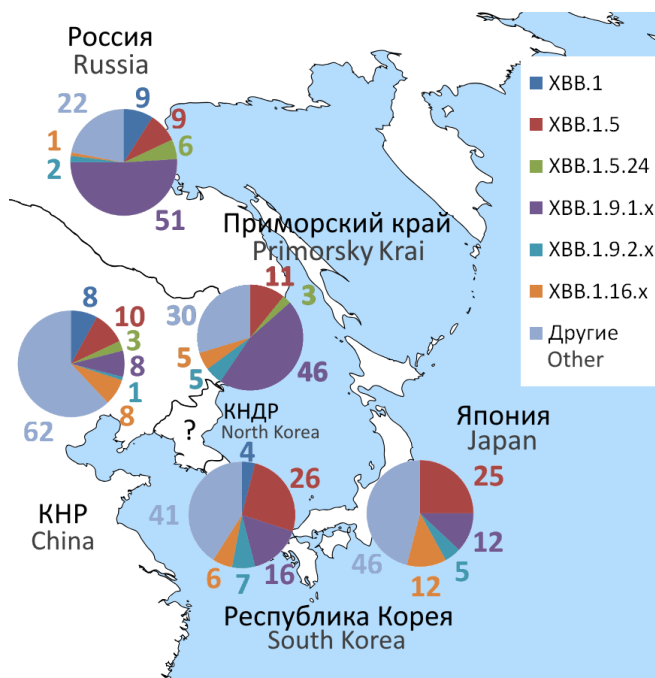


Fig. 4. Genetic diversity of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai, whole Russia, and neighboring countries of East Asia on the eve of the official end of the pandemic on May 05, 2023 (figures in the sectors of pie charts correspond to the percent portion of this genovariant according to GISAID).

cessation of transport links with Asia-Pacific countries, while the relative freedom of transport links between Russia and Europe as well as PK and central Russia was maintained throughout the pandemic.

Isolation of SARS-CoV-2 strains was successfully performed from 151 samples of RT-qPCR-positive nasopharyngeal washings (isolation efficiency was $151/217 \approx 69.6\%$). The obtained viral strains were deposited in the collection of pathogens of the G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Signs of cytopathic effect of the virus in Vero-E6 cell culture were observed from 2–4 days after infection (Fig. 5, a, b). The distribution of the obtained SARS-CoV-2 strains by genetic lineages is presented in Fig. 5, c, and by $\lg TCID_{50}$ values — in Table 4.

The main component plane for different periods of the COVID-19 pandemic in PK and Russia, considered as points in an eight-dimensional feature space, being the components of the SARS-CoV-2 distribution by genetic variants (Table 3), is shown in Fig. 6. The first two main components in Fig. 6, corresponding to the two largest eigenvalues of the feature covariance matrix, include 63.6% of information about the mutual location of objects in the multidimensional feature space. It is known that rotation of the main components by the same angle does not change the values of the eigenvalues of the covariance matrix [32, 38]: in Fig. 6, the rotation of components is performed in such a way as to maximize the variance of factor loadings.

Discussion

In Russia, the COVID-19 pandemic started later than in many countries due to the application of strict regime-limiting and anti-epidemic measures against

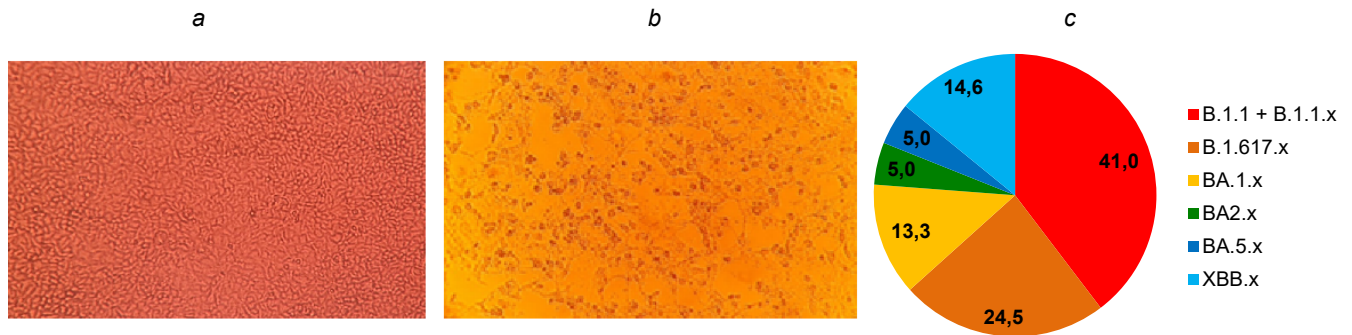


Fig. 5. SARS-CoV-2 strains isolated in the sensitive Vero-E6 cell line at the G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

a — intact cell line; *b* — cell line with manifestations of cytopathogenic action of the SARS-CoV-2 strain/Russia_Primerje/FE-R-6932 (Delta AY.122) for 5 days after infection (3 passage); *c* — the distribution of strains by genovariants (the numbers in the sectors of the pie charts correspond to the percentage of this genovariant).

Table 4. Infectious titers of SARS-CoV-2 strains isolated at the G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (2020–2023)

Genovariant of the strain	Number of strains	Distribution of strains according to the values of the decimal logarithm of the infectious titer, lg IT				<i>M ± m</i>	
		3	4	5	6		
Wuhan	B.1.1	49	2	8	11	28	5,3 ± 0,1
	B.1.1.1	2	0	0	1	1	5,5 ± 0,5
	B.1.1.317	4	0	1	2	1	5,0 ± 0,4
	B.1.1.397	5	0	0	2	3	5,6 ± 0,2
	B.1.1.485	1	0	0	1	0	5,0 ± 0,0
	B.1.143	1	0	1	0	0	4,0 ± 0,0
Delta	AY.121	1	0	0	1	0	5,0 ± 0,0
	AY.122	36	8	14	9	5	4,3 ± 0,2
Omicron	BA.1.x	20	10	4	6	0	3,8 ± 0,2
	BA.2	5	2	3	0	0	3,6 ± 0,2
	BA.5.2	5	1	3	1	0	4,0 ± 0,3
	XBB.x	22	13	8	1	0	3,5 ± 0,1

COVID-19, which were regulated by the Decrees of the President of the Russian Federation⁷, Orders of the Government of the Russian Federation⁸ and Resolutions of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation⁹. Measures to prevent the importation and

reduce the risk of spread of COVID-19 on the territory of the PK were introduced on the basis of the above mentioned decrees and orders, as well as the Decision of the Governor of the PK¹⁰ and the Chief State Sanitary Doctor of the PK¹¹. All the activities carried out at the initial stage made it possible to slow down the spread of COVID-19, increase the volume of COVID-19 tests and the capacity of laboratory bases, prepare medical organizations to provide assistance to patients, which prevented an increase in the number of cases of severe forms of the disease and mortality rate.

The analysis of COVID-19 epidemic process manifestations in the period from April 2020 to June

⁷ Presidential Decrees: No. 206 of 25.09.2020; No. 239 of 02.04.2020; No. 294 of 02.04.2020.

⁸ Orders of the Government of the Russian Federation: from 30.01.2020 No. 140-r; from 31.01.2020 No. 154-r; from 03.02.2020 No. 194-r; from 18.02.2020 No. 338-r; from 27.02.2020 No. 447-r; from 27.02.2020 No. 446-r; of 27.02.2020 No. 448-r; of 16.03.2020 No. 635-r; of 06.03.2020 No. 550-r; of 12.03.2020 No. 597-r; of 14.03.2020 No. 622-r; of 16 March 2020 No. 730-r; of 27.03.2020 No. 763-r.

⁹ Decisions of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation: from 24.01.2020 No. 2; from 31.01.2020 No. 3; from 02.03.2020 No. 5; from 13.03.2020 No. 6; from 18.03.2020 No. 7; from 30.03.2020 No. 9.

¹⁰ Resolution of the PK Governor of 18.03.2020 No. 21-pg.

¹¹ Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the PK of 20.04.2020 No. 17.

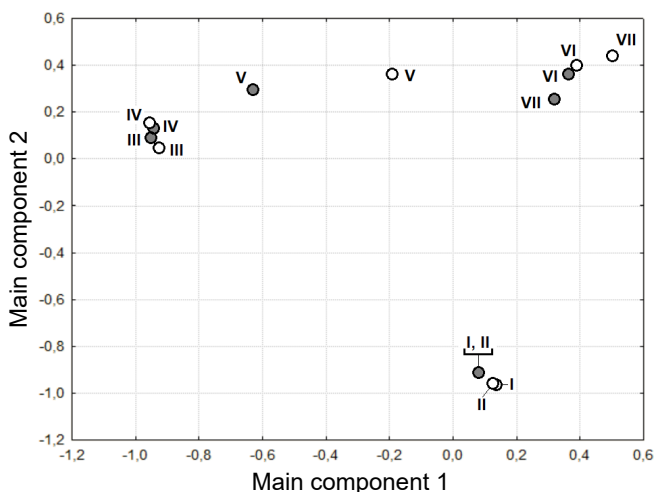


Fig. 6. The plane of the first two main components for various epidemic periods of COVID-19 indicated by Latin numerals (as in Figure 2 and Tables 2–3): the gray dots correspond to the Primorsky Krai, the white ones — to the Russian Federation.

2023 on the territory of the PK and Russia as a whole revealed 7 epidemiological upsurges of COVID-19 incidence, which differed in clinical and epidemiological manifestations of COVID-19 course depending on the genetic variant of the pathogen (Fig. 1, 2, Tables 2, 3). Comparison of COVID-19 incidence in each period showed that the dynamics of the epidemic process development in PK is similar to the all-Russian development, which is especially clearly demonstrated by Fig. 6. At the same time, mild and moderate clinical forms of the disease prevailed in the structure of clinical forms of the disease throughout the pandemic.

The introduction of restrictive measures in March–April 2020 practically stopped the movement of people between the PK and neighboring countries (China, Republic of Korea, Japan), as a result of which the dynamics of circulation of SARS-CoV-2 virus genetic variants in the region was explained exclusively by intra-Russian migration, therefore, during the I and II periods of the pandemic in the PK (as well as in Russia as a whole) the Wuhan genetic variant was dominant, during the III and IV periods — Delta, and during the V period and subsequent rises — various Omicron genetic variants (Fig. 2). The change of dominant genetic variants is illustrated in Fig. 3.

Since the middle of 2022, a gradual easing of the movement regime with neighboring countries began, which could not but affect the diversity of Omicron genetic variants circulating in PK. Thus, the proportion of XBB.1.9.2 and XBB.1.16 (Arcturus) variants was slightly higher in PK by the end of April — beginning of May 2023 than in Russia as a whole. At the same time, the percentage of the XBB.1.9.2 variant was the highest in the Republic of Korea, and the percentage of the XBB.1.16 variant — in Japan (Fig. 4). These data

suggest a certain involvement of neighboring countries of the Asia-Pacific region in shaping the genetic landscape of SARS-CoV-2 in PK at the final stage of the pandemic. The data of phylogenetic analysis of samples of the BN sub-variant, which is rare in Russia (Fig. 5), can also serve as indirect evidence of multiple pathways of virus entry into the region. At the same time, the proportion of registered COVID-19 cases in PK, the etiological factor of which was XBB.1.9.2 (5%) and XBB.1.16 (3%), was comparable to that in the Republic of Korea (XBB.1.9.2 — 7%) and Japan (XBB.1.16 — 12%; Fig. 4), in contrast to the average Russian values (XBB.1.9.2 — 2%, XBB.1.16 — 1%) [34–36]. These data suggest possible participation of the pathogen genetic variants circulating in the neighboring countries of the Asia-Pacific region in the formation of the genetic landscape of SARS-CoV-2 in PK at the final stage of the pandemic.

Phylogenetic analysis of isolates belonging to the BN lineage, which is poorly represented in Russia (about 150 specimens in GISAID) but is characteristic of the Republic of Korea [37], confirms the possibility that new virus variants may have been introduced into PK from this country. According to the Pango website, 37% of isolates of the BN.1.2 lineage, 41% of the BN.1.2.3 lineage, and 25% of the BN.1.3 lineage originate from the PK. Phylogenetic analysis of the most closely related SARS-CoV-2 samples from Russia and the Republic of Korea showed that sample prim000233 (BN.1.2, collection date 14.04.2023) belongs rather to the group of South Korean isolates, while sample prim000314 (BN.1.2.3, collection date 10.04.2023) belongs to the group of isolates isolated from the central part of Russia (Fig. 7; the low bootstrap support values for some clusters in this figure are explained by the high degree of homology of the analyzed sequences, which is typical of most regional studies of SARS-CoV-2 [38–42]). These results may also serve as indirect evidence of multiple pathways of virus entry into the region.

During the isolation of SARS-CoV-2 strains, a significant decrease in the titers of Delta and Omicron genetic variants was observed, indicating a decrease in their virulence (replication rate and virus accumulation) compared to Wuhan-like variants (Table 4). The obtained results are consistent with the epidemiological manifestations of the infectious process — increased infectivity of SARS-CoV-2 variants and decreased severity of clinical manifestations of infection.

The distribution of SARS-CoV-2 genotypes detected in clinical material (Fig. 1, *b, c*) shows the predominance of Omicron variant (59,7%), while among isolated strains Wuhan-like variants dominate (41,0%), which is explained by their higher virulence. This confirms the correctness of the choice of a strategy for rapid epidemiological monitoring based on sequencing of the full-length viral genome from primary clinical material

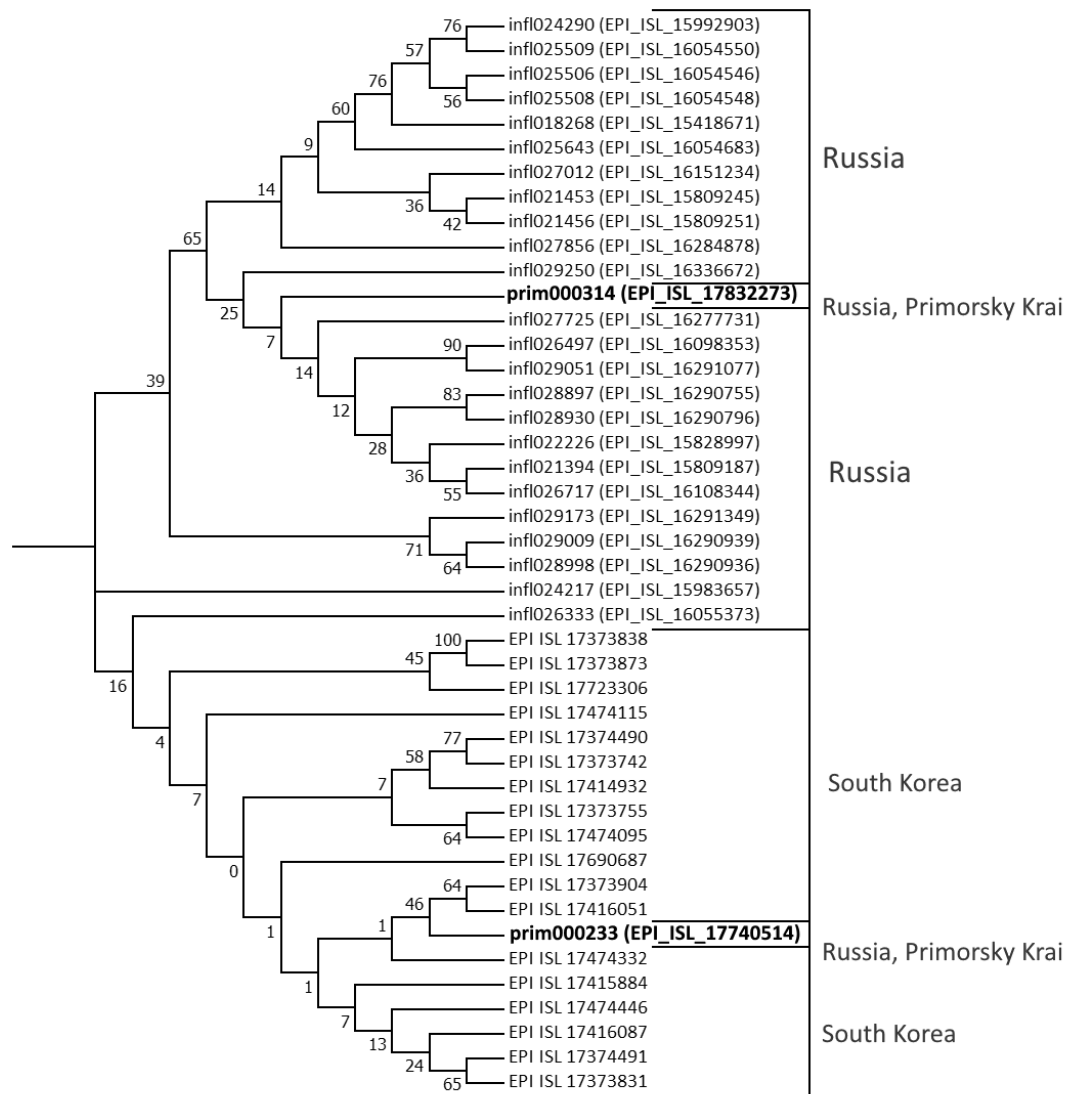


Fig. 7. Phylogenetic tree of the most homologous viruses of the BN line of SARS-CoV-2.

Numbers in VGARus and GISAID (in parentheses) databases are given for the samples from Russia. Numbers in GISAID database are given for the samples from Republic of Korea. Numbers of samples from Primorsky Krai are given in bold.

(although this does not exclude the need to isolate different variants of the pathogen for virological studies).

Thus, the uniqueness of the SARS-CoV-2 genotypic portrait formation on the territory of the PK during the COVID-19 pandemic lies in the possibility of virus importation both from the European part of Russia and from the countries of East Asia. The latter direction seems to be the most relevant in connection with the strategic "eastern vector" of foreign policy, which is consistently implemented by the Government of the Russian Federation. The continuing possibility

of emergence of new, particularly dangerous variants of the virus in neighboring countries makes molecular genetic monitoring for SARS-CoV-2 in the territory of the PK particularly relevant. Retrospective analysis of the epidemic process of COVID-19 in a particular territory is a prerequisite for the formation of models and forecasts of the situation development, allows to identify risk factors associated with the spread and severity of the disease, to assess the effectiveness of measures taken, to increase the reliability of biological safety provision.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г. и др. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(2):221–46. Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., et al. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(2):221–46. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-NOI-1412> EDN: <https://elibrary.ru/kziwrq>
2. Никифоров В.В., Колобухина Л.В., Сметанина С.В. и др. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. М.;2020. Nikiforov V.V., Kolobukhina L.V., Smetanina S.V., et al. *Novel Coronavirus Infection (COVID-19): Etiology, Epidemiology, Clinics, Diagnostics, Treatment, and Prophylaxis*. Moscow;2020. EDN: <https://elibrary.ru/hgqiyk>
3. Щелканов М.Ю. Этиология COVID-19. В кн.: *COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики. Руководство для врачей*. М.;2023:11–53. Shchelkanov M.Yu. Etiology of COVID-19. In: *COVID-19: from Etiology to Vaccine Prevention. Guide for Doctors*. Moscow;2023:11–53. DOI: <https://doi.org/10.33029/9704-7967-4-COV-2023-1-288> EDN: <https://elibrary.ru/gedddl>
4. Шестопалов А.М., Кононова Ю.В., Гаджиев А.А. и др. Биоразнообразие и эпидемический потенциал коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) рукокрылых. *Юг России: экология, развитие*. 2020;15(2):17–34. Shestopalov A.M., Kononova Yu.V., Gadzhiev A.A., et al. Biodiversity and epidemic potential of chiropteran coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *South of Russia: Ecology, Development*. 2020;15(2):17–34 DOI: <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-2-17-34> EDN: <https://elibrary.ru/csbxlk>
5. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А. и др. COVID-19: этиология, клиника, лечение. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(3):421–45. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., et al. COVID-19: etiology, clinic, treatment. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(3):421–45. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CEC-1473> EDN: <https://elibrary.ru/imaadb>
6. Щелканов М.Ю., Дунаева М.Н., Москвина Т.В. и др. Каталог вирусов рукокрылых (2020). *Юг России: экология, развитие*. 2020;15(3):6–30. Shchelkanov M.Yu., Dunaeva M.N., Moskvina N.V., et al. Catalog of bat viruses (2020). *South of Russia: Ecology, Development*. 2020;15(3):6–30. DOI: <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-3-6-30> EDN: <https://elibrary.ru/tzqsap>
7. Щелканов Е.М., Уколов С.С., Дунаева М.Н. и др. Эхолокация рукокрылых (Chiroptera Blumenbach, 1779) как элемент их экологической пластичности. *Юг России: экология, развитие*. 2020;15(4):6–20. Shchelkanov E.M., Ukolov S.S., Dunaeva M.N., et al. Echolocation of bats (Chiroptera Blumenbach, 1779) as the element of their ecological plasticity. *South of Russia: Ecology, Development*. 2020;15(4):6–20. DOI: <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-4-6-20> EDN: <https://elibrary.ru/mubjcm>
8. Щелканов М.Ю., Табакаева Т.В., Щелканов Е.М. и др. Паукообразные-эктопаразиты рукокрылых. Владивосток;2022. Shchelkanov M.Yu., Tabakaeva T.V., Shchelkanov E.M., et al. *Arachnids-Ectoparasites of Chiropterans*. Vladivostok;2022. DOI: <https://doi.org/10.24866/7444-5377-0> EDN: <https://elibrary.ru/ulhbco>
9. Щелканов М.Ю., Табакаева Т.В., Щелканов Е.М. и др. Насекомые-эктопаразиты рукокрылых. Владивосток;2022. Shchelkanov M.Yu., Tabakaeva T.V., Shchelkanov E.M., et al. *Insects-Ectoparasites of Chiropterans*. Vladivostok;2022. DOI: <https://doi.org/10.24866/7444-5404-3> EDN: <https://elibrary.ru/wfkucv>
10. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Львов Д.К. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. *Лечащий врач*. 2013;(10):49–54. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Lvov D.K. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic threat. *The Practitioner*. 2013;(10):49–54. EDN: <https://elibrary.ru/takhvr>
11. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;(2):94–8. Shchelkanov M.Yu., Ananiev V.Yu., Kuznetsov V.V., Shumatov V.B. Middle East respiratory syndrome: when will smouldering focus outbreak? *Pacific Medical Journal*. 2015;(2):94–8. EDN: <https://elibrary.ru/ulfnff>
12. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Эпидемическая вспышка Ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май–июль 2015 г.): причины, динамика, выводы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;(3):89–93. Shchelkanov M.Yu., Ananiev V.Yu., Kuznetsov V.V., Shumatov V.B. Epidemic outbreak of MERS in the Republic of Korea (May–July, 2015): reasons, dynamics, conclusions. *Pacific Medical Journal*. 2015;(3):89–93. EDN: <https://elibrary.ru/ulhaer>
13. Kiselev D., Matsvay A., Abramov I., et al. Current trends in diagnostics of viral infections of unknown etiology. *Viruses*. 2020;12(2):211. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12020211> EDN: <https://elibrary.ru/tvffro>
14. Акимкин В.Г., Семененко Т.А., Углева С.В. и др. COVID-19 в России: эпидемиология и молекулярно-генетический мониторинг. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2022;77(4):254–60. Akimkin V.G., Semeneko T.A., Ugleva S.V., et al. COVID-19 in Russia: epidemiology and molecular genetic monitoring. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(4):254–60. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn2121> EDN: <https://elibrary.ru/dozijs>
15. Грибова В.В., Окунь Д.Б., Шалфеева Е.А. и др. Облачный сервис для дифференциальной клинической диагностики острых респираторных вирусных заболеваний (в том числе – связанных с особо опасными коронавирусами) методами искусственного интеллекта. *Якутский медицинский журнал*. 2020;(2):44–7. Gribova V.V., Okun D.B., Shalfeeva E.A., et al. Cloud service for the differential clinical diagnostics of acute respiratory viral diseases (including those associated with highly contagious coronaviruses) with an application of methods of artificial intelligence. *Yakut Medical Journal*. 2020;(2):44–7. DOI: <https://doi.org/10.25789/YMJ.2020.70.13> EDN: <https://elibrary.ru/etwrev>
16. Латыпова М.Ф., Цибин А.Н., Комаров А.Г. и др. Организация геномного надзора за SARS-CoV-2 в структуре департамента здравоохранения города Москвы. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2022;30(S):1061–6. Latypova M.F., Tsibin A.N., Komarov A.G., et al. Organization of genomic surveillance for SARS-CoV-2 within the Moscow city health department. *Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine, Russian Journal*. 2022;30(S):1061–6. DOI: <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2022-30-s1-1061-1066> EDN: <https://elibrary.ru/mshhnn>

17. Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Хафизов К.Ф. и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: Динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):381–96. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Khafizov K.F., et al. COVID-19: Evolution of the pandemic in Russia. Report II: Dynamics of the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(4):381–96. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-295> EDN: <https://elibrary.ru/kvulas>
18. Щелканов М.Ю., Львов Д.Н., Федякина И.Т. и др. Динамика распространения пандемического гриппа A/H1N1 swl на Дальнем Востоке в 2009 г. *Вопросы вирусологии*. 2010;55(3):10–5. Shchelkanov M.Yu., Lvov D.N., Fedyakina I.T., et al. Trends in the spread of pandemic influenza A(H1N1) swl in the Far East in 2009. *Problems in Virology*. 2010;55(3):10–5. EDN: <https://elibrary.ru/muekiz>
19. Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Плоскирева А.А. и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение I: Проявления эпидемического процесса COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):381–96. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Ploskireva A.A., et al. COVID-19: Evolution of the pandemic in Russia. Report I: Manifestation of the COVID-19 epidemic process. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(4):381–96. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276> EDN: <https://elibrary.ru/xzgtfd>
20. Shcheglov B.O., Galkina I.V., Lembikov A.O., et al. Rhinolaryngological simulators based on 3D printing open up new opportunities for professional training. *Yakut Medical Journal*. 2020;(3):58–60. DOI: <https://doi.org/10.25789/YMJ.2020.71.16> EDN: <https://elibrary.ru/sxnomh>
21. Щеглов Б.О., Дунаева М.Н., Баранчугов И.А. и др. Макет дыхательных путей человека. Патент RF 2740727 C1; 2021. Shcheglov B.O., Dunaeva M.N., Baranchugov I.A., et al. Model of human respiratory tract. Patent RF 2740727 C1; 2021. EDN: <https://elibrary.ru/hmlszk>
22. Gonzalez-Recio O., Gutierrez-Rivas M., Peiro-Pastor R., et al. Sequencing of SARS-CoV-2 genome using different nanopore chemistries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021;105(8):3225–34. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11250-w>
23. Brejova B., Borsova K., Hodorova V., et al. Nanopore sequencing of SARS-CoV-2: Comparison of short and long PCR-tiling amplicon protocols. *PLoS One*. 2021;16(10):e0259277. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259277>
24. Felsenstein J. *Inferring Phylogenies*. Sunderland, Massachusetts;2003.
25. Крылова Н.В., Иунихина О.В., Федореев С.А. и др. Анти-SARS-CoV-2 активность полифенольного комплекса из *Maackia amurensis*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023;176(8):216–9. Krylova N.V., Iunikhina O.V., Fedoreev S.A., et al. Anti-SARS-CoV-2 activity of the polyphenol complex from *Maackia amurensis*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;176(8):216–9. DOI: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-8-216-219> EDN: <https://elibrary.ru/ivgjae>
26. Krylova N.V., Kravchenko A.O., Iunikhina O.V., et al. Influence of the structural features of carrageenans from red algae of the Far Eastern seas on their antiviral properties. *Marine Drugs*. 2022;20(1):60. DOI: <https://doi.org/10.3390/md20010060> EDN: <https://elibrary.ru/yuukig>
27. Щелканов М.Ю., Сахурия И.Б., Полякова Е.Б. и др. Повышение качества МТТ-метода с помощью микродозаторных наконечников специальной конструкции. *Иммунология*. 1998;(4):57–9. Shchelkanov M.Yu., Sakhuria I.B., Polyakova E.B., et al. Improvement of the MTT-based assay by modification of pipette tips. *Immunology (Moscow)*. 1998;(4):57–9. EDN: <https://elibrary.ru/mpawbj>
28. Щелканов М.Ю., Ерёмин В.Ф., Сахурия И.Б. и др. Дегидрогеназная активность инфицированных клеток и биологические свойства различных вариантов ВИЧ-1. *Биохимия*. 1999;64(4):513–9. Shchelkanov M.Yu., Eremin V.F., Sakhuria I.B., et al. Dehydrogenase activity of infected cells and biological properties of HIV-1 variants. *Biochemistry (Moscow)*. 1999;64(4):431–6. EDN: <https://elibrary.ru/lfiulj>
29. Бейли Н. *Математика в биологии и медицине*. Пер. с англ. М.;1970. Bailey N. *The Mathematical Approach to Biology and Medicine*. London-NY-Sydney;1967.
30. Урбах В.Ю. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. М.;1975. Urbach V.Yu. *Statistical Analysis in Biological and Medical Research*. Moscow;1975.
31. Щелканов М.Ю., Пашкова Т.А., Сахурия И.Б. и др. Анализ биологических характеристик первичных изолятов ВИЧ-1 с помощью метода главных компонент. *Вопросы вирусологии*. 1998;43(3):117–21. Shchelkanov M.Yu., Pashkova T.A., Sakhuria I.B., et al. Analysis of biological characteristics of primary HIV-1 isolates using the main components method. *Problems in Virology*. 1998;43(3):117–21. EDN: <https://elibrary.ru/mqdzqr>
32. Щелканов М.Ю., Юдин А.Н., Бурунова В.В. и др. Применение метода главных компонент для анализа эффективности панелей эпитоп-имитирующих пептидов при серотипировании ВИЧ. *Иммунология*. 1999;20(3):13–8. Shchelkanov M.Yu., Yudin A.N., Burunova V.V., et al. Application of the basic components method for analysis of effectiveness of epitope-imitating peptides panels in HIV serotyping. *Immunology (Moscow)*. 1999;20(3):13–8. EDN: <https://elibrary.ru/yrqjqn>
33. Tamura T., Ito J., Uriu K., et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants. *Nat. Commun.* 2023;(14):2800. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38435-3>
34. Yamasoba D., Uriu K., Plianichaisuk A., et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 omicron XBB.1.16 variant. *Lancet Infect. Dis.* 2023;23(6):655–6. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(23\)00278-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(23)00278-5)
35. WHO. XBB.1.16 Updated Risk Assessment; 05 June 2023. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/05062023xbb.1.16.pdf?sfvrsn=fl845468_3
36. Lee D.W., Kim J.M., Park A.K., et al. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 Omicron variants in the Republic of Korea. *Sci. Rep.* 2022;12(1):22414. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26803-w>
37. Kim I.H., No J.S., Kim J.A., et al. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 variants in South Korea between January 2020 and February 2023. *Virology*. 2023;587:109869. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109869>
38. Браверман Э.М., Мучник И.Б. *Структурные методы обработки эмпирических данных*. М.;1983. Braverman E.M., Muchnik I.B. *Structural Methods of Empirical Data Processing*. Moscow;1983.
39. Basheer A., Zahoor I. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 divulge B.1, B.1.36, and B.1.1.7 as the most dominant lineages in first, second, and third wave of SARS-CoV-2 infections in Pakistan. *Microorganisms*. 2021;9(12):2609. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122609>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

40. Goletic T., Konjhodzic R., Fejzic N., et al. Phylogenetic pattern of SARS-CoV-2 from COVID-19 patients from Bosnia and Herzegovina: lessons learned to optimize future molecular and epidemiological approaches. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2021;21(4): 484–7. DOI: <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.5381>
41. Menasria T., Aguilera M. Genomic diversity of SARS-CoV-2 in Algeria and North African Countries: What we know so far and what we expect? *Microorganisms.* 2022;10(2):467. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020467>
42. Градобоева Е.А., Тюлько Ж.С., Фадеев А.В. и др. Сравнительный анализ разнообразия линий SARS-CoV-2, циркулирующих в Омской области в 2020–2022 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2022;21(6):24–33. Gradoboeva E.A., Tyulko J.S., Fadeev A.V., et al. Comparative analysis of the diversity of SARS-CoV-2 lines circulating in the Omsk region in 2020-2022. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2022;21(6):24–33. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-6-24-33>

Information about the authors

Anna Yu. Popova — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9032>

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sci. (Biol.), Director, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Head, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Natalia V. Krylova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of respiratory infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; assistant professor, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Alexey A. Belik — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of respiratory infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0303-3188>

Lyubov M. Semeikina — postgraduate student, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Deputy Head, Department of epidemiology, Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0009-0002-1095-7968>

Tatyana S. Zaporozhets — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of respiratory viral infections, Deputy Director for science, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8879-8496>

Vyacheslav Yu. Smolenskiy — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1773-4097>

Elena V. Persianova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of respiratory viral infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5686-8672>

Marina N. Prosyannikova — Head, Laboratory of viral and particularly dangerous bacterial infections, Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0009-0002-5265-8106>

Yuriy A. Belov — junior researcher, Head, Center for molecular diagnostics, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; assistant, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, <https://orcid.org/0000-0001-8313-5610>

Olga V. Iunikhina — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of zoonotic infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; assistant professor, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Anastasiya B. Pott — researcher, Laboratory of respiratory viral infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1235-4960>

Tatyana F. Khomichuk — Head, Department of epidemiology, Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0009-0007-3941-228X>

Anna I. Simakova — D. Sci. (Med.), Head, Department of infectious diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3334-4673>

Svetlana A. Abramova — junior researcher, Pathology laboratory, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Olga B. Romanova — chief physician, Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2290-8610>

Информация об авторах

Попова Анна Юрьевна — д.м.н., профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9032>

Щелканов Михаил Юрьевич — д.б.н., директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; зав. каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Крылова Наталья Владимировна — д.б.н., в.н.с., зав. лаб. респираторных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; доцент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Белик Алексей Анатольевич — к.б.н., н.с. лаб. респираторных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0303-3188>

Семейкина Любовь Михайловна — аспирант НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; зам. зав. отделом эпидемиологии Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0009-0002-1095-7968>

Запорожец Татьяна Станиславовна — д.м.н., г.н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций, зам. директора по научной работе НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8879-8496>

Смоленский Вячеслав Юрьевич — к.м.н., зам. руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1773-4097>

Персиянова Елена Викторовна — к.б.н., с.н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5686-8672>

Просьянникова Марина Николаевна — зав. лаб. вирусных и особо опасных бактериальных инфекций Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0009-0002-5265-8106>

Белов Юрий Александрович — м.н.с., зав. Центром молекулярной диагностики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; ассистент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8313-5610>

Иунихина Ольга Викторовна — к.м.н., зав. лаб. зоонозных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; доцент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Потт Анастасия Борисовна — н.с. лаб. респираторных вирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1235-4960>

Хомичук Татьяна Фатеевна — зав. отделом эпидемиологии Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0009-0007-3941-228X>

Симакова Анна Ивановна — д.м.н., зав. каф. инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского университета, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3334-4673>

Tatyana N. Detkovskaya — Head, Office of the Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare for the Primorsky Krai, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7543-0633>

Sergey P. Kryzhanovskiy — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Head, Medical Association, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1981-1079>

Natalia N. Besednova — D. Sci. (Med.), Professor, Full Member of the Russian Academy of Sciences, main researcher, Laboratory of immunobiological preparations, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Chief Researcher, Research Department, Medical Association of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>

Author contribution: *Popova A.Yu.* — idea of the article, general management of the research, writing the text of the article, analysis and interpretation of the data obtained, approval of the final version of the article; *Shchelkanov M.Yu.* — writing the text of the article, formulating research objectives, analyzing and interpreting the data obtained, editing the text, approving the final version of the article; *Krylova N.V., Belik A.A.* — writing the text of the article, laboratory research, analysis and interpretation of the data obtained, text editing; *Semeikina L.M.* — laboratory research, analysis and interpretation of the data obtained; *Zaporozhets T.S.* — formulation of research objectives, laboratory research, analysis and interpretation of the data obtained; *Smolensky V.Yu.* — general research management, analysis and interpretation of the data obtained; *Persyanova E.V., Belov Yu.A., Iunikhina O.V., Pott A.B., Abramova S.A.* — writing the text of the article, laboratory research, analysis and interpretation of the data obtained; *Prosyannikova M.N., Khomichuk T.F., Simakova A.I., Romanova O.B.* — collection of clinical and epidemiological data, analysis and interpretation of the data obtained; *Detkovskaya T.N.* — collection of clinical and epidemiological data, coordination of interaction between Rospotrebnadzor institutions when performing research, analysis and interpretation of the data obtained; *Kryzhanovskiy S.P.* — collection of clinical and epidemiological data, coordination of interaction with medical institutions when carrying out research, analysis and interpretation of the data obtained; *Besednova N.N.* — idea of the article, general research management, analysis and interpretation of the data obtained. 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 04.01.2024;
accepted for publication 20.02.2024;
published 28.02.2024

Абрамова Светлана Алексеевна — м.н.с. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Романова Ольга Борисовна — главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2290-8610>

Детковская Татьяна Николаевна — руководитель Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7543-0633>

Крыжановский Сергей Петрович — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Медицинского объединения Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1981-1079>

Беседнова Наталия Николаевна — д.м.н., профессор, академик РАН, г.н.с. лаб. иммунобиологических препаратов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; главный научный сотрудник научно-исследовательского отдела Медицинского объединения Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>

Участие авторов: *Попова А.Ю.* — идея статьи, общее руководство исследованиями, написание текста статьи, анализ и интерпретация полученных данных, утверждение окончательного варианта статьи; *Щелканов М.Ю.* — написание текста статьи, формулировка задач исследования, анализ и интерпретация полученных данных, редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; *Крылова Н.В., Белик А.А.* — написание текста статьи, лабораторные исследования, анализ и интерпретация полученных данных, редактирование текста; *Семейкина Л.М.* — лабораторные исследования, анализ и интерпретация полученных данных; *Запорожец Т.С.* — формулировка задач исследования, лабораторные исследования, анализ и интерпретация полученных данных; *Смоленский В.Ю.* — общее руководство исследованиями, анализ и интерпретация полученных данных; *Персиянова Е.В., Белов Ю.А., Иунихина О.В., Потт А.Б., Абрамова С.А.* — написание текста статьи, лабораторные исследования, анализ и интерпретация полученных данных; *Просьянникова М.Н., Хомичук Т.Ф., Симакова А.И., Романова О.Б.* — сбор клинических и эпидемиологических данных, анализ и интерпретация полученных данных; *Детковская Т.Н.* — сбор клинических и эпидемиологических данных, координация взаимодействия между учреждениями Роспотребнадзора при выполнении исследований, анализ и интерпретация полученных данных; *Крыжановский С.П.* — сбор клинических и эпидемиологических данных, координация взаимодействия с лечебными учреждениями при выполнении исследований, анализ и интерпретация полученных данных; *Беседнова Н.Н.* — идея статьи, общее руководство исследованиями, анализ и интерпретация полученных данных. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 04.01.2024;
принята к публикации 20.02.2024;
опубликована 28.02.2024

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-496>

Single intranasal immunization with attenuated Wuhan-like SARS-CoV-2 provides highly effective cross-protection against Delta and Omicron variants of concern

Evgeny B. Faizuloev^{1,2✉}, Anastasiia V. Gracheva¹, Ekaterina R. Korchevaya¹, Yulia I. Ammour¹, Daria I. Smirnova¹, Darya M. Khokhlova¹, Andrey O. Drovkov³, Andrey A. Pankratov⁴, Galina V. Trunova⁴, Varvara A. Khokhlova⁴, Maria S. Vorontsova⁴, Irina A. Leneva¹, Oxana A. Svitich^{1,3}, Vitaly V. Zverev^{1,3}

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

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;

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

⁴P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Despite the end of the COVID-19 pandemic, the problem of vaccine prevention of this disease appears highly relevant. The emergence and widespread distribution of the Omicron SARS-CoV-2 variant of concern (VOC) and its sublineages has dramatically reduced the efficacy of vaccination. The possible approach to solving this problem is to develop a nasal live attenuated vaccine capable of activating humoral, mucosal, and cell-mediated immunity, providing a prolonged immune response and cross-protection against different VOCs.

The **aim** of the study was to determine the immunization efficacy with attenuated cold-adapted Wuhan-like SARS-CoV-2 D-D2 strain against homologous and heterologous challenges.

Materials and methods. The study was conducted on an animal model of coronavirus pneumonia in golden Syrian hamsters. The efficacy of immunization was assessed by comparing the dynamics of weight, viral load in organs and histopathological changes in the lungs in immunized and unimmunized animals.

Results. Single intranasal immunization of golden Syrian hamsters with D-D2 strain showed its high immunogenicity: seroconversion was evident in all immunized animals. Wuhan-like D-D2 strain provides highly effective protection of hamsters against the development of productive infection and pneumonia when challenged both with ancestral virus and heterologous strains related to Delta (AY.122) and Omicron (sublineages BA.1.1 and BA.5.2) variants.

Conclusion. SARS-CoV-2 attenuation is a promising strategy for the development of a highly effective nasal live COVID-19 vaccine.

Keywords: *live attenuated COVID-19 vaccine, cold-adapted SARS-CoV-2, immunization efficacy, intranasal immunization, heterologous challenge, cross-protective immune response, golden Syrian hamsters*

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 Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera Institutional Animal Care and Use Committee (protocol No. 2, May 24, 2021).

Funding source. The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 23-25-00146, <https://rscf.ru/en/project/23-25-00146/>. The study was carried out using equipment of the Collective Usage Center "I. I. Mechnikov NIIVS", Moscow, Russia.

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

For citation: Faizuloev E.B., Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Ammour Yu.I., Smirnova D.I., Khokhlova D.M., Drovkov A.O., Pankratov A.A., Trunova G.V., Khokhlova V.A., Vorontsova M.S., Leneva I.A., Svitich O.A., Zverev V.V. Single intranasal immunization with attenuated Wuhan-like SARS-CoV-2 provides highly effective cross-protection against Delta and Omicron variants of concern. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):36–51.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-496>

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

Однократная интраназальная иммунизация аттенуированным Ухань-подобным SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную перекрёстную защиту от заражения вариантами Delta и Omicron

Файзулов Е.Б.^{1,2✉}, Грачева А.В.¹, Корчевая Е.Р.¹, Амму Ю.И.¹, Смирнова Д.И.¹,
Хохлова Д.М.¹, Дроков А.О.³, Панкратов А.А.⁴, Трунова Г.В.⁴, Хохлова В.А.⁴,
Воронцова М.С.⁴, Ленева И.А.¹, Свитич О.А.^{1,3}, Зверев В.В.^{1,3}

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

²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия;

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

⁴Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Несмотря на окончание пандемии COVID-19, проблема вакцинопрофилактики этого заболевания сохраняет актуальность. Появление и широкое распространение варианта SARS-CoV-2 Omicron и его сублиний привело к резкому снижению эффективности вакцинопрофилактики COVID-19. Возможным подходом к решению этой проблемы является разработка назальной живой аттенуированной вакцины, способной активировать гуморальный, мукозальный и клеточно-опосредованный иммунитет, обеспечивая стойкий иммунный ответ и перекрёстную защиту от различных антигенных вариантов вируса.

Целью исследования была оценка эффективности иммунизации аттенуированным холодадаптированным Ухань-подобным штаммом SARS-CoV-2 D-D2 при гомологичном и гетерологичном заражении.

Материалы и методы. Исследование проведено на животной модели коронавирусной пневмонии на основе золотистых сирийских хомячков. Эффективность иммунизации оценивали путём сравнения динамики веса, вирусной нагрузки в органах и гистопатологических изменений лёгких у иммунизированных и неиммунизированных животных.

Результаты. Однократная интраназальная иммунизация золотистых сирийских хомячков штаммом D-D2 показала его высокую иммуногенность: сероконверсия проявилась у всех иммунизированных животных. Аттенуированный Ухань-подобный штамм D-D2 обеспечивал высокоэффективную защиту хомячков от развития продуктивной инфекции и пневмонии при заражении как родительским вирусом, так и гетерологичными штаммами, относящимися к вариантам Delta (AY.122) и Omicron (сублинии BA.1.1 и BA.5.2).

Заключение. Аттенуация SARS-CoV-2 является перспективной стратегией для разработки высокоэффективной назальной живой вакцины против COVID-19.

Ключевые слова: живая аттенуированная вакцина против COVID-19, холодадаптированный SARS-CoV-2, эффективность иммунизации, интраназальная иммунизация, гетерологичное заражение, перекрёстная протективная активность, золотистые сирийские хомячки

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 2 от 24.05.2021).

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-25-00146, <https://rscf.ru/project/23-25-00146/>. В исследовании использовано научное оборудование центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» — при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России.

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

Для цитирования: Файзулов Е.Б., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Амму Ю.И., Смирнова Д.И., Хохлова Д.М., Дроков А.О., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Воронцова М.С., Ленева И.А., Свитич О.А., Зверев В.В. Однократная интраназальная иммунизация аттенуированным Ухань-подобным SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную перекрёстную защиту от заражения вариантами Delta и Omicron. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):36–51.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-496>

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

Introduction

Despite the end of the COVID-19 pandemic declared by WHO, the problem of vaccine prevention of this disease continues to be relevant. Inactivated, vector, subunit, and mRNA vaccines are used for COVID-19 prevention and have been shown to be highly effective against homologous infection (i.e., infection with the same virus variant as the strain used for vaccine) [1]. The emergence and widespread distribution of the SARS-CoV-2 Omicron variant of concern (VOC) and its sublineages have dramatically reduced the efficacy of vaccination [1–3]. Most licensed COVID-19 vaccines are directed toward the formation of humoral immunity based on the induction of neutralizing antibodies to the SARS-CoV-2 S-protein. However, the evolution of the virus under the mass immunization pressure makes this target highly variable, resulting in the virus escaping immunological surveillance and a rapid decline in vaccine efficacy against newly emerging SARS-CoV-2 variants [2–4].

Emergent optimization of the composition of existing vaccines according to the current set of circulating SARS-CoV-2 variants is necessary to maintain vaccination efficacy at a high level [5]. Development of a "universal" vaccine with cross-protective activity against different antigenic variants of the virus could represent an alternative approach. Such approach includes development of a live attenuated vaccine (LAV) capable of activating not only the humoral but also the cellular immune system, providing a prolonged immune response and cross-protection against different virus variants [6–8]. At present, the potential of LAV in COVID-19 prevention remains unrealized. At the same time, some experience has already been gained in obtaining attenuated SARS-CoV-2 strains that have shown high immunogenicity and immunization efficacy in animal models of infection. Some authors use genetic engineering and reverse genetics techniques such as site-directed mutagenesis and codon deoptimization to attenuate the virus [9–13]. Others use the traditional approach to obtain virus mutants by prolonged passaging in cell culture under selective conditions [14–17]. Regardless of the methodology used to attenuate the virus, an important question that determines the practical relevance of LAV at the current stage is whether it can provide effective protection against the "parent" SARS-CoV-2 strain, but also against new, phylogenetically distant virus variants.

Earlier, by long-term passaging of Wuhan-like SARS-CoV-2 Dubrovka strain in Vero cells at lower temperature (up to 23°C), we obtained its cold-adapted (*ca*) variant called D-D2 strain [18]. D-D2 strain exhibited a temperature-sensitive (*ts*) phenotype (it did not replicate at 39°C), which determined its reduced replication in the lungs of golden Syrian hamsters and, thus, an attenuated (*att*) phenotype. During intranasal immunization of hamsters, D-D2 strain exhibited high immu-

nogenicity and protected against infection with homologous parental Dubrovka strain and the development of pneumonia [15]. The aim of the present study was to determine the immunization efficacy of attenuated Wuhan-like SARS-CoV-2 strain against heterologous challenge with strains belonging to the Delta variant and two sublineages of Omicron variant, BA.1.1 and BA.5.2. For immunization, *ca/ts/att* D-D2 strain was used as a model vaccine strain.

Materials and methods

Viruses. To model coronavirus pneumonia on Syrian golden hamsters (hereinafter referred to as hamsters) we used laboratory strains of SARS-CoV-2 (family: *Coronaviridae*, genus: *Betacoronavirus*, subgenus: *Sarbecovirus*, species: *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*): Dubrovka (Wuhan-like), Podolsk (Delta); Otradnoe (Omicron BA.1.1), and FEB2 (Omicron BA.5.2) isolated and genetically characterized in different periods of pandemic in our laboratory (**Table 1**). A cold-adapted D-D2 strain with *ts* and *att* phenotype, which we obtained earlier by adapting the Dubrovka strain for growth in Vero CCL-81 cell culture at lower temperature (23°C), was used to immunize animals [18].

Virus cultivation in cell culture

SARS-CoV-2 laboratory strains were cultured on African green monkey kidney epithelial Vero CCL-81 cells (ATCC), as described earlier [19]. Monolayer of Vero cells was infected with the SARS-CoV-2 at a low multiplicity of infection ($MOI \leq 0,001$) and incubated at 37°C (Dubrovka, Podolsk, Otradnoe and FEB2 strains) or 23°C (D-D2 strain) for 3–8 days (depending on virus strain) in an atmosphere of 5% CO₂. Virus-containing culture medium was clarified by centrifugation and stored at –80°C before use.

Animals

Four-week-old 40–50 g female Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were obtained from the Nursery for laboratory animals of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Russia). Hamsters were arbitrarily assigned to study groups. Animals were kept as described earlier [20]. All studies with animals were approved by the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera Institutional Animal Care and Use Committee (protocol No. 2, May 24, 2021) and carried out in accordance with the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011).

Virus titration

The SARS-CoV-2 virus titers were determined by the cytopathic effect endpoint method in Vero cells as described earlier [19]. The virus titer was calculated by

Table 1. SARS-CoV-2 strains used in the study

Strain	Collection date	GenBank ID	Variant	Pangolin lineage	Passage level	Cultivation temperature, °C
Dubrovka	June 2020	MW514307.1	Wuhan-like (wild-type)	B.1.1.317	17	37
D-D2	June 2020	ON040961.1	Wuhan-like (cold-adapted)	B.1.1.317	47	23
Podolsk	August 2021	ON032860.1	Delta	AY.122	16	37
Otradnoe	January 2022	ON032857.1	Omicron	BA.1.1	8	37
FEB2	October 2022	OP920753.1	Omicron	BA.5.2	4	37

the Reed–Muench method using an online-calculator¹ and expressed as \log_{10} TCID₅₀/ml.

Quantification of SARS-CoV-2 RNA

Quantification of SARS-CoV-2 RNA was performed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method [20]. Viral RNA was isolated from samples using “MagnoPrime UNI” reagent kit (“NextBio”), recommended by the manufacturer for isolation viral RNA from a wide range of biological and clinical samples. To detect viral RNA we used primers and the probe designed for the SARS-CoV-2 nucleocapsid *N* gene: CoVN-F GCGTTCTTC-GGAATGTCG, COVN-R TTGGATCTTTGTCATC-CAATTTG, COVN-P FAM-AACGTGGTTGACCTA-CACAGGT-BHQ1 [21]. A 2.5x Taq-polymerase reaction mixture reagent kit and MMLV reverse transcriptase (Syntol) were used to perform one-step reverse transcription real-time PCR reaction. 50 µL reaction mixture contained 5 units of Taq DNA polymerase, 30 units of MMLV reverse transcriptase, 10 pmol of each primer and 5 pmol of probe. Thermal cycling process included 45°C — 10 min (1 cycle); 95°C — 5 min (1 cycle); 95°C — 5 sec, 55°C — 45 sec (45 cycles). Synthetic oligonucleotide corresponding to the fragment of SARS-CoV-2 genome containing the primers and probe binding sites were used to construct a calibration curve: COVN-PC CAGCGTTCTTCGGAATGTCGC-GCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAAC-GTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTG-GATGACAAAGATCCAAA. The analytical sensitivity of the real-time PCR established by analyzing 10-fold dilutions of the COVN-PC oligonucleotide (SARS-CoV-2 cDNA standard) was 5×10^2 copies per ml. Adjusted for losses at the stages of RNA isolation and reverse transcription, the sensitivity of SARS-CoV-2 RNA detection was assumed to be 10^3 copies per ml. The typical standard curve of dependence of Ct values on the concentration of viral RNA was described by the equation:

$$Y = 48.816 \times 3.5348X,$$

where *Y* is Ct value; *X* is concentration of viral RNA (Log₁₀ copies/mL).

The results of RT-PCR were expressed as copies of viral RNA per mL of tissue homogenate.

Evaluation of the immunization efficacy

Immunization efficacy was assessed according to the scheme (**Fig. 1**). Syrian hamsters were divided into nine groups (G1–G9) of six animals each. Each animal of groups G1–G4 received intranasally $4.0 \log_{10}$ TCID₅₀ in 100 µL of the D-D2 strain. Intranasal administration of the virus was carried out under diethyl ether anesthesia. Animals of groups G5–G9 were not immunized and received PBS intranasally. 21 days post-immunization (p.i.), blood was taken from the animals to assess the total and neutralizing antibodies to SARS-CoV-2. To evaluate the immunization efficacy 28 days p.i., each animal of groups 1–8 was challenged by $4.0 \log_{10}$ TCID₅₀ in 100 µL of the virulent SARS-CoV-2 strain intranasally. Groups G1 and G5 received ancestral Dubrovka strain, groups G2 and G6 — Podolsk strain (Delta), groups G3 and G7 — Otradnoe strain (Omicron BA.1.1), groups G4 and G8 — FEB2 strain (Omicron BA.5.2). The negative control group G9 received an equivalent amount of PBS. Hamsters were observed daily and weight control was performed daily from days 0 to 4. Four days after the challenge, animals were humanely euthanized under chloroform anesthesia. Left lungs were collected for histological examination. Lung, brain, and other organ tissues were collected, homogenized in DMEM medium with gentamicin (40 µg/mL) using a “Tissue Lyser LT homogenizer” (“Qiagen”), and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4°C. Supernatants were collected and stored at –80°C for subsequent titration and determination of viral RNA. The immunization efficacy was evaluated by comparing the weight dynamics, viral load in the organs, and histopathological changes in lungs in immunized and unimmunized animals.

Lung histological examination

Lung histological examination was performed as described earlier [15]. Formalin-fixed paraffin-embedded left hamster lungs stained by hematoxylin and eosin were used for histological study. Histological sections of the lungs scored blindly for lung damage, using a cumulative severity score of 0 to 3 each for an extended range of parameters as recently suggested [22],

¹ URL: <https://www.virosoin.org/tcid50/TCID50.html>

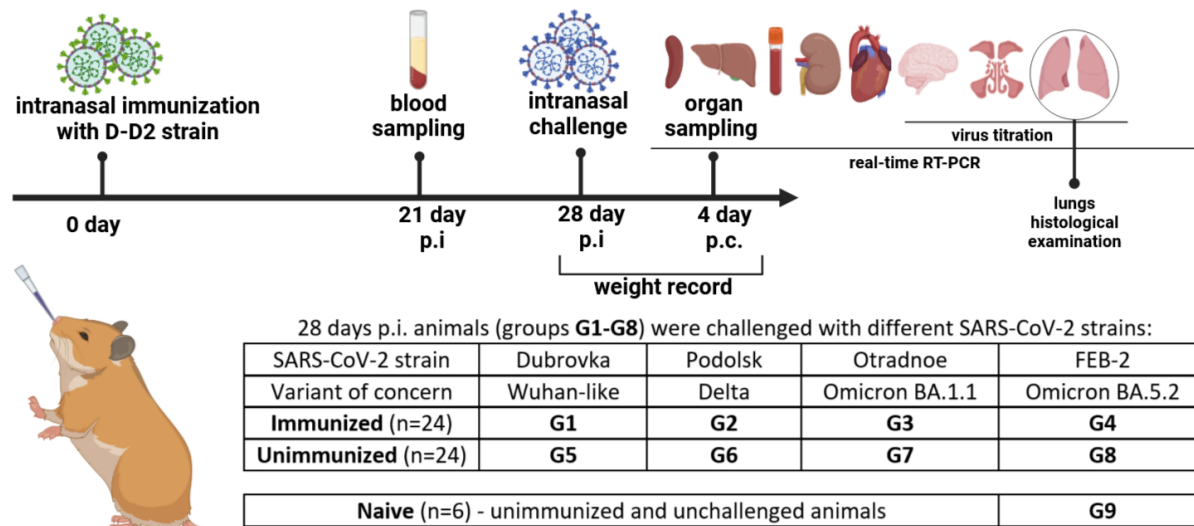


Fig. 1. The design of the experiment for evaluating the immunization efficacy.

i.e. % of lung area affected, distribution of lesions, necrosis of bronchial ciliated epithelial cells, cellular debris in bronchi, diffuse alveolar damage, necrosis of alveolar cells, cellular debris in alveoli, alveolar hemorrhage, alveolar edema, perivascular/interstitial edema, vasculitis, necrosis and desquamation of vascular endothelial cells, bronchitis, bronchiointerstitial pneumonia, interstitial pneumonia, intraalveolar neutrophils and macrophages, hyperplasia of bronchial ciliated epithelial cells, hyperplasia of type II alveolar cells. The maximum possible score was 60.

Detection of antibodies to SARS-CoV-2

Detection of antibodies to SARS-CoV-2 in hamster's sera was performed by the ELISA method as described earlier [15]. For ELISA, 96-well plates were coated with a UV-inactivated SARS-CoV-2 virions of Dubrovka strain, prepared as described by [20].

Viral neutralization test

Measurement of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies based on cytopathic effect in Vero cells was performed according to the protocol described earlier [19]. Dubrovka, Podolsk, Otradnoe, and FEB2 SARS-CoV-2 strains adapted to Vero cells were used to determine the neutralizing activity against different antigenic variants. The neutralizing titer was considered the reciprocal value of the last dilution, in which no signs of cytopathic effect were detected in two or more wells.

Statistical analysis

Statistical processing was performed using GraphPad Prism v. 5.03 software. The data were presented as the mean \pm standard deviation (SD) and mean \pm standard error (SEM) on the plots. The differences were compared using paired sample t-test. Differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

Work safety requirements

All work with the SARS-CoV-2 virus was carried out under conditions of a Biosafety Level-3 laboratory.

Results

Evaluation of the immunogenicity and efficacy of attenuated D-D2 strain (a cold-adapted mutant of Dubrovka strain) was performed in an experiment on golden Syrian hamsters immunization according to the scheme (Fig. 1). Hamsters of groups G1–G4 ($n = 24$) were intranasally immunized with the D-D2 strain at the dose of $4.0 \log_{10}$ TCID₅₀ per animal.

Immunogenicity evaluation

After 21 days p.i., IgG antibodies to SARS-CoV-2 proteins in ELISA were detected in sera of all immunized animals in titers ranging from 12,800 to 204,800 (mean $54,933 \pm 44,257$) (Fig. 2, a). The virus-neutralizing activity of hamsters' sera after immunization with the D-D2 strain was maximal for homologous Dubrovka strain 793 ± 524 (Fig. 2, b). For heterologous strains, the neutralizing activity of sera was lower for the Podolsk strain (Delta) by four times for Otradnoe and FEB2 strains (Omicron) by 46 times. In 56% of sera samples, the neutralizing activity against Otradnoe and FEB2 strains was not detected. In the sera of non-immunized animals (groups G5–G9; $n = 30$) no antibodies to the virus were detected either by ELISA or in the neutralization test.

Evaluation of the immunization efficacy

Twenty-eight days after immunization, the animals were challenged with different SARS-CoV-2 strains according to the scheme (Fig. 1). Challenge of unimmunized animals (groups G5–G8) with different strains revealed their different virulence for Syrian hamsters. The Dubrovka strain proved to be the

most virulent and resulted in weight loss of 14.6% ($p = 0.0002$) on average at day 4 p.c. (Fig. 3), the most severe pneumonia (Fig. 4, 5), infection not only respiratory tract but also brain (Fig. 6, 7), that was accompanied by decreased appetite, lethargy, and sleepiness. When unimmunized animals were infected with Podolsk, Otradnoe, and FEB2 strains, weight loss was not significant

($p > 0.05$), average by 2.15%, 1.2%, and 2.4% compared to group G9 (naive), while lung histopathology and the viral load in the brain were lower than infected with the Dubrovka strain (Fig. 4–7).

All immunized hamsters showed no delay in weight gain and no changes in behavior compared to unimmunized animals (Fig. 3). Among the immunized an-

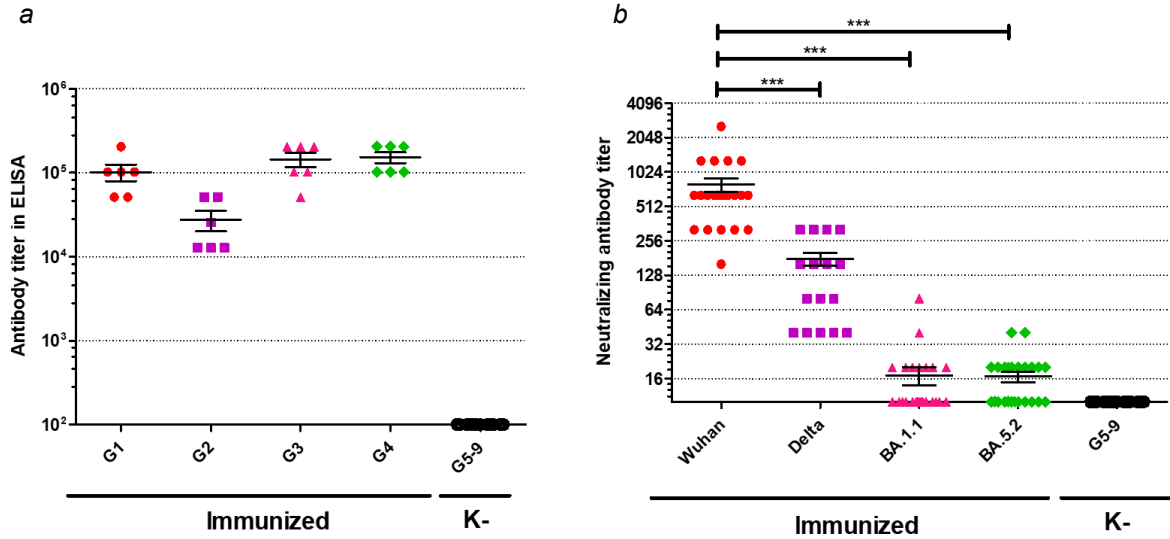


Fig. 2. Immunogenicity of the D-D2 strain in hamsters following single intranasal administration. Hamsters of G1–G4 groups were immunized with the D-D2 strain.

a — titer of IgG antibody to SARS-CoV-2 proteins by ELISA; b — titers of neutralizing antibodies against different SARS-CoV-2 strains in the sera of all animals from groups G1–G4 ($n = 24$) — Dubrovka (Wuhan), Podolsk (Delta), Otradnoe (BA.1.1), and FEB2 (BA.5.2). The limit of detection was 20. *** $p < 0.001$.

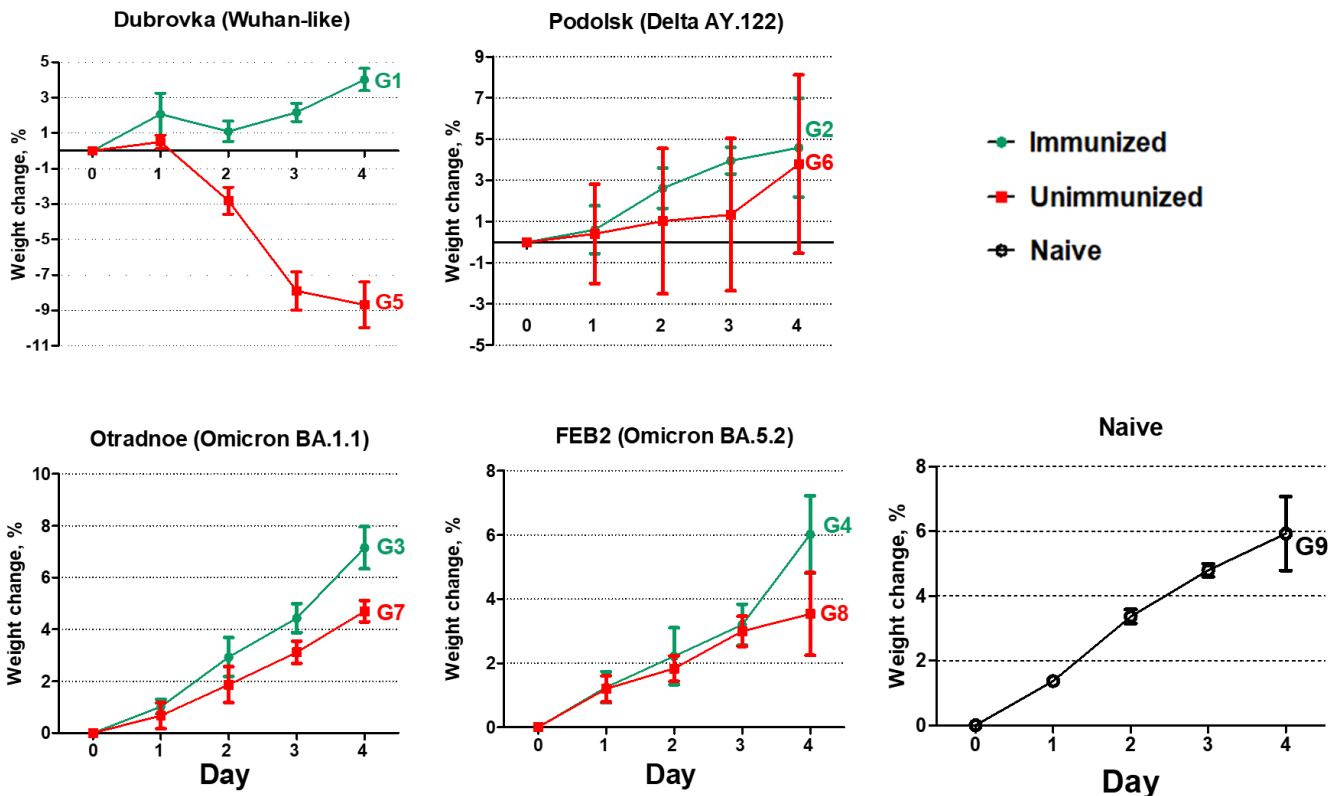


Fig. 3. Weight change of immunized and unimmunized hamsters at days 1–4 post-challenge.

imals (groups G1–G4), the strongest protection against weight loss was observed in group G1 infected with the Dubrovka strain, reaching 12.7% ($p < 0.0001$) at day 4 p.c. When infected with the strains Podolsk (group G2) and FEB2 (group G4) the difference in the weight of the immunized and unimmunized animals was non-significant ($p > 0.05$), reaching 2.61% and 2.48% at day 4 p.c., respectively. When infected with the strain Otradnoe (group G3) the difference in the weight of the immunized and unimmunized animals was significant ($p = 0.02$), reaching 2.45% at days 3 and 4 p.c.

Morphological changes in the lungs of challenged unimmunized hamsters (groups G5–G9) corresponded to interstitial pneumonia, but the severity and prevalence of the lesions depended on the strain (Fig. 4). On the fourth day post-challenge (p.c.) with Wuhan-like strain Dubrovka (group G5), histological preparations of animal lungs showed pronounced alveolar and inflammatory changes, which morphologically corresponded to bronchointerstitial pneumonia. Areas of

pneumonia occupied from 50% to 90% of the histological section of the organ indicating the subtotal degree of spread of the inflammatory process in hamster lungs. In the lungs of hamsters of group G6 challenged with the Podolsk (Delta) strain, foci of bronchointerstitial pneumonia occupied from 15 to 50% of the organ slice area. The lung morphology of hamsters in groups 7 and 8, challenged with the Otradnoe (Omicron BA 1.15) and FEB (Omicron BA 5.2) strains, showed significant differences, despite the close phylogenetic relationship between these strains. After the challenge with the Otradnoe strain, the lungs preparations revealed foci of bronchointerstitial pneumonia, which occupied not more than 5–7% of the organ slice area. Contrary, when infected with the FEB2 strain, foci of pneumonia occupied from 40 to 60%, and the morphological pattern of inflammatory changes was similar to that in hamsters challenged with the Dubrovka strain (Fig. 4).

Histological examination of the lungs of immunized hamsters (groups G1–G4) 4 days p.c. with differ-

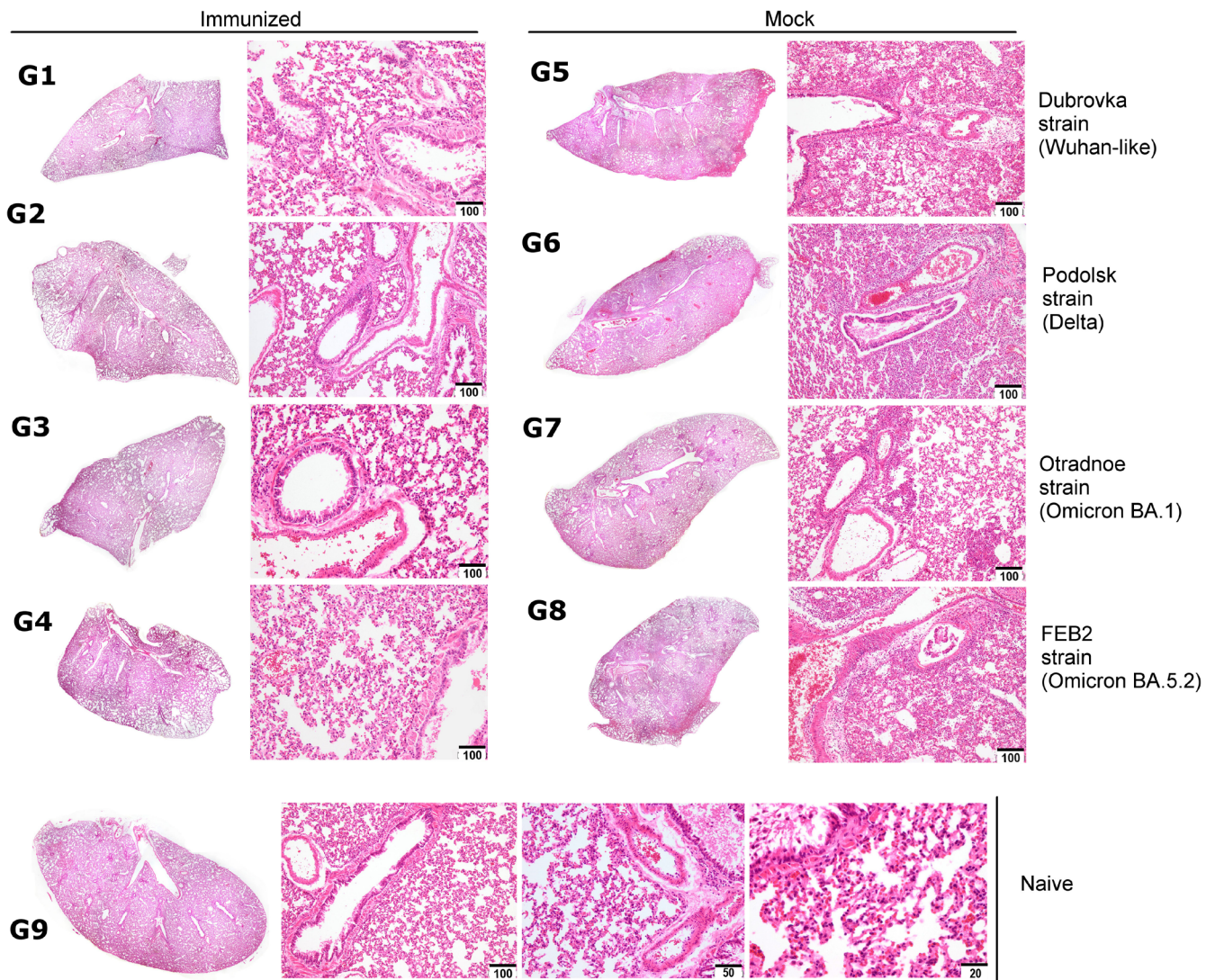


Fig. 4. Morphological changes of hamster lungs on day 4 post-challenge with different SARS-CoV-2 strains. Hematoxylin and eosin staining. The size of the scale bar is expressed in microns.

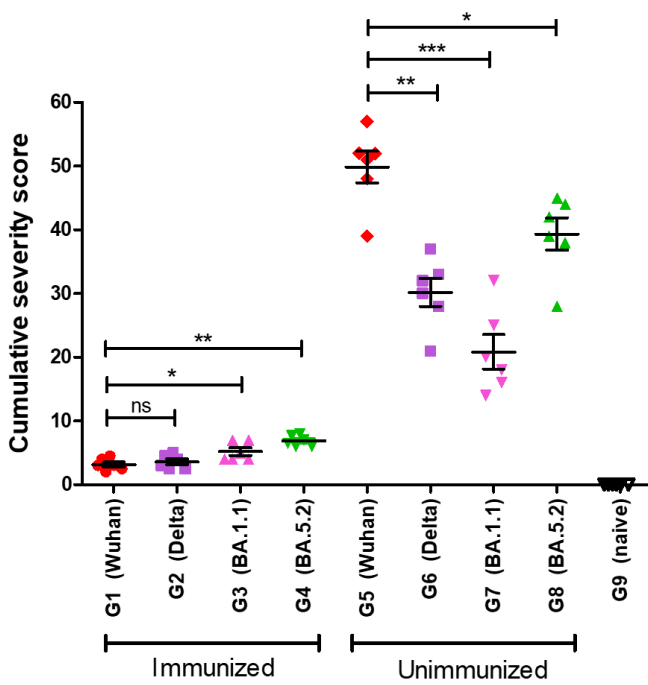


Fig. 5. Histopathology score for hamster lungs on day 4 post-challenge with different SARS-CoV-2 strains.
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

ent strains did not reveal pathological changes, while inflammatory changes were mild (Fig. 4). No pathological changes were detected in hamster lungs immunized and challenged with Dubrovka (group G1) and Podolsk (group G2) strains. The histological structure of the

airways and respiratory zone of the lungs appeared normal. Lungs from immunized hamsters challenged with Otradnoe (group G3) and FEB2 (group G4) strains showed focal slightly expressed inflammatory changes in the bronchi, while the morphology of respiratory zone did not differ from those in negative control animals (group G9).

Histological examination of lung preparations of unimmunized uninfected hamsters (group G9, naive) revealed no pathological changes (Fig. 4).

Thus, histological examination of the lungs showed that immunization with the D-D2 strain protects animals from the development of viral pneumonia regardless of the SARS-CoV-2 strain used for infection.

Based on histological examination, pathological changes in the lungs of animals of groups G1–G9 were given a score according to A.D. Gruber et al. [22] (Fig. 5). In immunized animals (groups G1–G4), cumulative severity score varied on average from 3.2 to 6.9, while in unimmunized animals (groups G5–G9) — from 20.8 to 49.8. Immunization of hamsters with the D-D2 strain reduces the lungs histopathology score when challenged with the Dubrovka strain by 15.7 times ($p < 0.01$), Podolsk — 8.4 times ($p < 0.01$), Otradnoe — 4.0 times ($p < 0.01$), FEB2 — 5.7 times ($p < 0.01$). At the same time, immunized animals challenged with Omicron-like strains Otradnoe and FEB2 had significantly higher lungs histopathology scores (5.2 ± 1.5 and 6.9 ± 0.9 , respectively), compared to hamsters challenged with ancestral Dubrovka strain (3.2 ± 0.1).

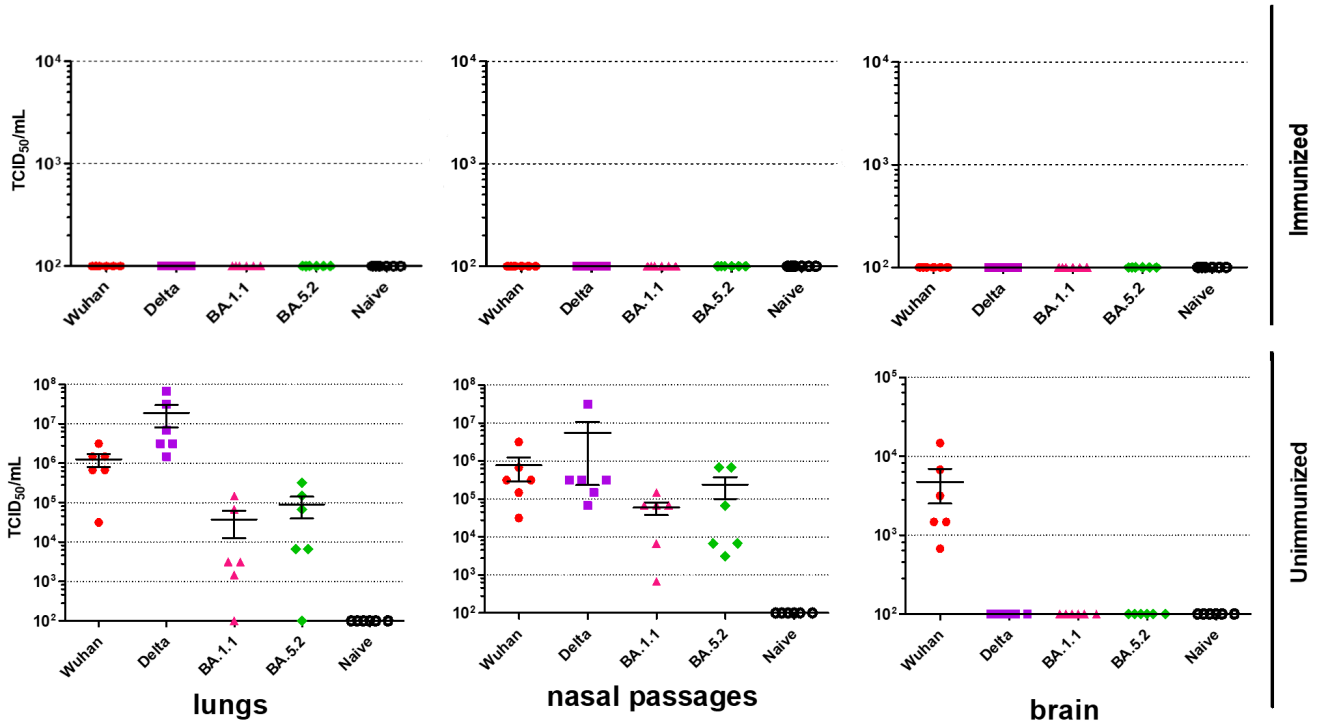


Fig. 6. Virus titer in lungs, nasal passages, and brain of immunized and unimmunized hamsters.
 The limit of detection was $2.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$.

Single intranasal immunization with the D-D2 strain protected hamsters from developing a productive infection when infected with all SARS-CoV-2 strains as evidenced by the absence of infectious virus in lungs, nasal passages, and brain of all animals from groups G1-G4 (Fig. 6). All unimmunized animals (groups G5-G8) developed infection, as confirmed by virus isolation from the lungs and nasal passages (Fig. 6). The mean values of virus titer in the lungs of unimmunized animals ranged from 4.57 to 7.28 \log_{10} TCID₅₀/mL, and in the nasal passages from 4.78 to 6.74 \log_{10} TCID₅₀/mL. In the brain samples from group G5, which consisted of six unimmunized animals infected with the Dubrovka strain, the infectious virus was found in all cases. In contrast, no infectious

virus was detected in the brain samples of animals in other groups.

Viral RNA in the lungs, brain, heart, liver, kidneys, spleen, and blood of immunized animals (groups G1–G4) was not detected in the vast majority of animals, except for some hamsters in which RNA was detected at the limit of detection of the method. A low concentration of viral RNA was detected in the nasal passages of immunized animals, averaging 4.7 to 5.8 \log_{10} RNA copies/mL (Fig. 7). Differences in viral RNA from nasal passages between groups of immunized and non-immunized hamsters varied depending on the strain used for challenge from 2.9 to 5.5 \log_{10} : Dubrovka strain — 3.7 ($p < 0.001$), Podolsk — 4.5 ($p < 0.05$), Otradnoe — 2.9 ($p < 0.05$), and FEB2 — 3.2 ($p < 0.05$) \log_{10} .

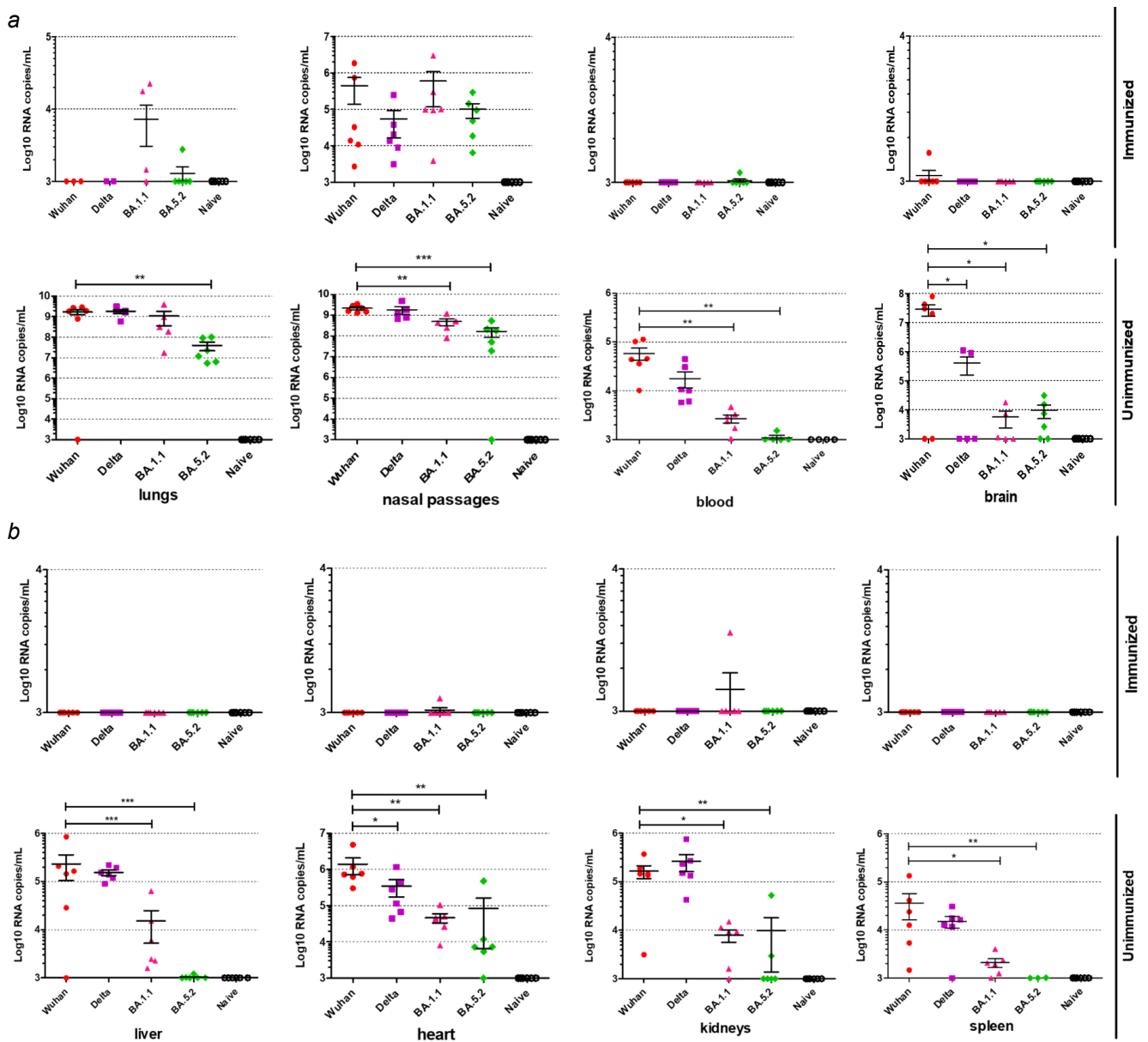


Fig. 7. Concentration of viral RNA in organs of immunized and unimmunized hamsters on 4 days post-challenge.

a — lungs, nasal passages, blood, and brain; b — liver, heart, kidneys and spleen.
The limit of detection was 3.0 \log_{10} RNA copies/mL. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In the lungs of unimmunized animals (groups G5–G9), the concentration of viral RNA ranged on average from 7.60 to 9.25 log₁₀, in the nasal passages from 8.22 to 9.34, and in the brain from 3.76 to 7.46 log₁₀ RNA copies per mL of homogenate. In the heart, liver, kidneys, spleen, and blood of most unimmunized animals, viral RNA was also detected, but at a lower level than in the lungs and nasal passages (from 3.02 to 6.15 log₁₀ RNA copies per mL of homogenate) (Fig. 7). Notably, when infected with the FEB2 strain, viral RNA was not detected in the liver and spleen of all animals used.

Discussion

The most outstanding achievements of public health are associated with the mass use of live vaccines: the global eradication of smallpox, the elimination of polio in most countries, a multiple reduction in the incidence of measles, rubella, mumps, rotavirus enteritis, and chickenpox. In this regard, the study of the potential of live attenuated vaccines (LAV) for the prevention of COVID-19 seems very relevant. In this study, we investigated the efficacy of the COVID-19 LAV prototype (D-D2 strain) on golden Syrian hamsters challenged with ancestral and heterologous strains of SARS-CoV-2.

Single intranasal immunization of Syrian hamsters with *ca/ts/att* SARS-CoV-2 D-D2 strain showed its high immunogenicity — seroconversion at 21 days p.i. was observed in all 24 immunized animals (Fig. 2, a). Antibodies titers to SARS-CoV-2 in sera of immunized hamsters as measured in ELISA, using virions of the “parental” Dubrovka strain as an immunosorbent, averaged 5×10^5 . At the same time, the maximum neutralizing activity of sera was shown against the homologous Wuhan-like strain, Dubrovka strain. For the heterologous virus strains related to Delta and especially Omicron, the neutralizing activity was predictably lower or absent (Fig. 2, b), which is consistent with changes in the antigenic properties of the virus S-protein in the course of evolution and the results of previous studies [2, 3, 15, 23, 24].

Despite the reduced (or absent) neutralizing activity of post-vaccination antibodies against heterologous strains, immunization with the D-D2 strain protected hamsters against infection not only with the ancestral Dubrovka strain but also with strains belonging to Delta and Omicron VOCs. Significant protection against weight loss was shown when the animals were infected with the Dubrovka strain: immunized animals weighed 13% more ($p < 0.01$) than unimmunized animals at day 4 p.c. (Fig. 3). Heterologous strains, Podolsk, Otradnoe, and FEB2, showed less virulence for Syrian hamsters manifested in a slight decrease in weight of unimmunized animals. Consequently, the protection of immunized animals against weight loss of 2–4% when infected with Podolsk, Otradnoe, and FEB2 strains was not significant.

The replication level of the virus in the lungs and other organs, as well as the severity of inflammatory changes in the lungs, were more informative in assessing immunization efficacy. The absence of infectious virus in the main target organs (lung, nasal passages, and brain) in immunized animals (groups G1–G4) on the fourth day after the challenge allows us to characterize immunity to SARS-CoV-2 as “sterilizing”. This conclusion is supported by the fact that in the vast majority of immunized animals, viral RNA in homogenates of lungs, brain, blood, and other organs was below the limit of detection of RT-PCR (Fig. 7). Viral RNA was detected in the nasal passages of all immunized animals, while its concentration was 2.9–4.5 log₁₀ lower, than in unimmunized animals (Fig. 7, a). At the same time, no infectious virus was detected in the nasal passages of immunized hamsters (Fig. 6). A possible explanation for this is that the challenge was carried out by inoculation of the virus directly into the nasal passages, therefore, the nasal mucosa primarily contact with the virus and become infected. As a result, limited viral RNA replication occurs in nasal epithelial cells, but the infectious virus shedding as well as infection of lung and other organs was hindered by acquired immunity factors.

The absence of viral replication in the lungs of immunized animals is consistent with the absence of marked lung histopathology there (Figs. 4, 5). Slightly pronounced focal inflammatory changes in the bronchi revealed in the lungs of immunized hamsters infected with heterologous strains, Otradnoe and FEB2 (Figs. 4, 5), probably indicate limited virus replication due to “escape” of BA.1.1 and BA.5.2 Omicron sublineages from adaptive immunity formed after immunization with Wuhan-like strain. Thus, single intranasal immunization of Syrian hamsters with the D-D2 strain provided strong robust protection of animals against development of productive infection and pneumonia not only after homologous but also heterologous infection four weeks after immunization.

It is noteworthy that a significant viral RNA load was detected in the hearts of non-immunized animals challenged with different SARS-CoV-2 strains (up to 6.0 log₁₀ copies of RNA/mL in group challenged with Wuhan-like virus) (Fig. 7B). These results are consistent with data from other studies showed pathological changes, viral RNA, and infectious virus in the hearts of Syrian hamsters infected with SARS-CoV-2 [25, 26]. These data are of particular importance in the context of the fact that COVID-19 increases the risk of myocarditis in humans [27, 28], which is likely due to increased expression of the ACE2 receptor in human myocytes [29].

The genetic stability of the D-D2 strain and the possibility of virulence reversion have not been investigated. Therefore, we are not yet consider the D-D2 strain as a candidate for development of COVID-19

LAV, but as a model vaccine strain to study post-vaccinal immunity.

Mass vaccination against COVID-19 has shown that licensed vaccines poorly protect against infection with the strains belonging to Omicron VOC. They provide a level of protection required against severe COVID-19 infection and death during the Omicron dominance [30, 31]. However, the post-vaccine protection against infection and symptomatic infection with the Omicron strains composed only 40–50% for mRNA vaccines (declared as the most effective vaccines) in the first 3 months p.i., and declines rapidly to 10–20% thereafter [30–33]. Booster immunization can restore this value to baseline, but the duration of the resulting immunity does not exceed 3–6 months [31, 32, 34–36]. Licensed vaccines (inactivated, vector, recombinant, and mRNA vaccines) based on the S-protein of SARS-CoV-2 stimulate both humoral and cellular immunity ([37–39]; however, apparently their efficacy is mainly determined by the induction of neutralizing antibodies. Variability of the S-protein and the emergence of new VOCs leads to a rapid escape of the virus from immunological surveillance and a decrease in the effectiveness of such vaccines [2, 3, 23, 24, 40]. The ongoing evolution of the Omicron VOC has led to the emergence of such of its sublineages that escape adaptive immunity induced even by previous infection with parental Omicron sublineages. Thus, sublineages BF.7, BQ.1, and XBB (which appeared after sublineage BA.4/5), escape neutralization by antibodies, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and phagocytosis, induced by breakthrough infection with sublineage BA.1 [41]. In addition, the sublineages BF.7 and BQ.1 have the greatest resistance to neutralization by a panel of 77 monoclonal antibodies that effectively neutralize the Wuhan-like virus [42].

The higher efficacy of intranasally administered LAV is based on the same mechanisms that are involved in the development of adaptive immunity during natural respiratory virus infection [37, 43, 44]. Combined activation of the humoral and cellular components of the systemic and mucosal (local) immune defenses can provide effective protection against SARS-CoV-2 infection [8, 37, 45]. Furthermore, an immune response is developed against all viral proteins of LAV, both structural and nonstructural, increasing the efficacy. Thus, structural proteins M and N are highly immunogenic and, together with nonstructural proteins, are more conserved than the S-protein. Furthermore, many T-cell epitopes of phylogenetically related species of coronaviruses and various SARS-CoV-2 variants are located not only in the S-protein [46, 47]. Thus, J. Zhao et al., using peripheral blood mononuclear cells isolated from COVID-19 patients, identified 5 immunodominant T-cell epitopes in the N-protein of SARS-CoV-2 [47]. It should also be noted that protective immunity mediated by T-cells is less dependent on mutations that determine the

formation of new SARS-CoV-2 VOCs [48, 49]. Indeed the appearance of new SARS-CoV-2 VOCs is determined mainly by mutations in the most variable S-protein, whereas T-cell epitopes are present not only in the S-protein, but also in more conserved viral proteins.

In recent studies, the immunogenicity and efficacy of attenuated SARS-CoV-2 strains were investigated on animal models of coronavirus infection, such as golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), *Phodopus roborovskii* hamsters and K18-hACE2 transgenic mice line. Immunization of susceptible animals with attenuated strains of SARS-CoV-2 has been found to provide highly effective protection against homologous infection and development of pneumonia [9–17]. However, the potential for cross-protective activity of LAVs against heterologous variants of the virus has not been extensively investigated. J. Trimpert et al. showed that immunization with attenuated SARS-CoV-2 leads to the development of immunity in laboratory animals when infected not only with the parental strain of the virus but also with unrelated Alpha and Beta VOC strains [50]. A. Yoshida et al. showed the development of cross-protection against infection with the Omicron (BA.1) VOC strain in hamsters immunized with the recombinant attenuated virus with the S-protein gene "transferred" from Omicron [13]. Our study shows that the attenuated Wuhan-like SARS-CoV-2 strain can provide highly effective protection not only against the homologous challenge but also when challenged with heterologous strains belonging to Delta VOC, BA.1.1 and BA.5.2 Omicron VOC sublineages.

The cross-protection shown in our study was predictable because at the time the study was designed it was known that naturally acquired SARS-CoV-2 infection prevents up to 90% of reinfection with Alpha, Beta, or Delta VOCs and 56% of reinfection with Omicron VOC strains, while most reinfection cases occur only one year after the primary disease [51]. Furthermore, the protective efficacy of primary infection against the development of severe disease or death in reinfection with the Omicron is 97.3% (95% CI 94.9–98.6%), regardless of the virus variant that caused the primary infection [52]. The extremely low rate of severe and fatal cases of reinfection potentially points out that COVID-19 LAV can provide effective protection against pneumonia and death caused by heterologous strains. The high potential of LAVs for COVID-19 prevention is supported by the observation that hybrid immunity (vaccination followed by a breakthrough infection) and SARS-CoV-2 reinfections reduce the risk of subsequent infections caused by the Omicron strains by 60% and 85%, respectively [53]. Meanwhile, boosterization by breakthrough Omicron infection induces higher levels of memory B-cell and SARS-CoV-2-specific T-cells, particularly against the Omicron strains, compared with booster immunization with inactivated or vector vaccines [54].

Noteworthy, practically all developers of LAVs against COVID-19 achieve effective protection against challenges with the virulent strain by intranasal administration [9–17]. In this regard, the successful mass use of mucosal vaccines such as live polio and rotavirus vaccines (administered orally) and live influenza vaccines (administered intranasally) are revealing. Oral and intranasal administration of these vaccines provides not only induction of systemic cellular and humoral adaptive immune response but also the formation of mucosal (local) immunity, including secretion of specific IgA-antibodies in the respiratory or intestinal mucosa. During intranasal immunization followed by infection with a virulent strain, specific secretory IgA-antibodies neutralize the virus directly on the mucosa of the respiratory tract, which is the

site of entry of infection, suppressing its adhesive ability and reducing the efficiency of transmission [8, 55, 56].

Conclusions

The results of the present study showed that single intranasal immunization of Syrian hamsters with attenuated Wuhan-like strain of SARS-CoV-2 provides strong robust protection of animals against infection and development of pneumonia when challenged not only with homologous virus but also with heterologous strains belonging to Delta (AY.122) and Omicron (sublineages BA.1 and BA.5.2) VOCs. Thus, creation of attenuated SARS-CoV-2 strains is a promising strategy for the development of highly effective live vaccines against COVID-19 on their basis.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Feikin D.R., Higdon M.M., Abu-Raddad L.J., et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet*. 2022;399(10328):924–44. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00152-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00152-0)
- Bowen J.E., Addetia A., Dang H.V., et al. Omicron spike function and neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of vaccines. *Science*. 2022;377(6608):890–4. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abq0203>
- Dejnirattisai W., Huo J., Zhou D., et al. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell*. 2022;185(3):467–84.e15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.046>
- Xiang T., Wang J., Zheng X. The humoral and cellular immune evasion of SARS-CoV-2 Omicron and sub-lineages. *Virol. Sin*. 2022;37(6):786–95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.11.007>
- Chalkias S., Harper C., Vrbicky K., et al. A bivalent omicron-containing booster vaccine against COVID-19. *N. Engl. J. Med*. 2022;387(14):1279–91. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2208343>
- Chen J.M. Should the world collaborate imminently to develop neglected live-attenuated vaccines for COVID-19? *J. Med. Virol*. 2022;94(1):82–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.27335>
- Goławski M., Lewandowski P., Jabłońska I., Delijewski M. The reassessed potential of SARS-CoV-2 attenuation for COVID-19 vaccine development – a systematic review. *Virus-es*. 2022;14(5):991. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14050991>
- Nouailles G., Adler J.M., Pennitz P., et al. Live-attenuated vaccine sCPD9 elicits superior mucosal and systemic immunity to SARS-CoV-2 variants in hamsters. *Nat. Microbiol*. 2023;8(5):860–74. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01352-8>
- Liu S., Stauff C.B., Selvaraj P., et al. Intranasal delivery of a rationally attenuated SARS-CoV-2 is immunogenic and protective in Syrian hamsters. *Nat. Commun*. 2022;13(1):6792. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34571-4>
- Liu Y., Zhang X., Liu J., et al. A live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate with accessory protein deletions. *Nat. Commun*. 2022;13(1):4337. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31930-z>
- Trimpert J., Dietert K., Firsching T.C., et al. Development of safe and highly protective live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidates by genome recoding. *Cell Rep*. 2021;36(5):109493. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109493>
- Ye Z.W., Ong C.P., Tang K., et al. Intranasal administration of a single dose of a candidate live attenuated vaccine derived from an NSP16-deficient SARS-CoV-2 strain confers sterilizing immunity in animals. *Cell. Mol. Immunol*. 2022;19(5):588–601. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00855-4>
- Yoshida A., Okamura S., Torii S., et al. Versatile live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine platform applicable to variants induces protective immunity. *iScience*. 2022;25(11):105412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105412>
- Abdoli M., Shafaati M., Ghamsari L.K., Abdoli A. Intranasal administration of cold-adapted live-attenuated SARS-CoV-2 candidate vaccine confers protection against SARS-CoV-2. *Virus Res*. 2022;319:198857. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198857>
- Faizuloev E., Gracheva A., Korchevaya E., et al. Cold-adapted SARS-CoV-2 variants with different temperature sensitivity exhibit an attenuated phenotype and confer protective immunity. *Vaccine*. 2023;41(4):892–902. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.12.019>
- Seo S.H., Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-CoV-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-CoV-2 infection. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4):584. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8040584>
- Xu J., Liu M., Niu X., et al. The cold-adapted, temperature-sensitive SARS-CoV-2 strain TS11 is attenuated in Syrian hamsters and a candidate attenuated vaccine. *Viruses*. 2022;15(1): 95. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15010095>
- Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Грачева А.В. и др. Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(4):397–409. Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Gracheva A.V., et al. Biological characterization of cold-adapted SARS-CoV-2 variants. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(4):397–409. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-280> EDN: <https://elibrary.ru/llegeh>
- Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М. и др. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021;98(3):253–65. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., et al. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):253–65. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136> EDN: <https://elibrary.ru/jglovv>
- Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Ammour Y.I., et al. Immunogenic properties of SARS-CoV-2 inactivated by ultraviolet light. *Arch. Virol*. 2022;167(11):2181–91. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05530-7>
- Chan J.F.W., Yip C.C.Y., To K.K.W., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol*. 2020;58(5):e00310-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Gruber A.D., Osterrieder N., Bertzbach L.D., et al. Standardization of reporting criteria for lung pathology in SARS-CoV-2-infected hamsters: what matters? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2020;63(6):856–9. DOI: <https://doi.org/10.1165/rmb.2020-0280LE>
- Aiano F., Ireland G., Baawuah F., et al. Antibody persistence after primary SARS-CoV-2 infection and protection against future variants including omicron in adolescents: national, prospective cohort study. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2023;42(6):496–502. DOI: <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000003890>
- Wang Y., Ma Y., Xu Y., et al. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma. *Emerg. Microbes Infect*. 2022;11(1):424–7. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2027219>
- Daems M., Liesenborghs L., Boudewijns R., et al. SARS-CoV-2 infection causes prolonged cardiomyocyte swelling and inhibition of HIF1 α translocation in an animal model COVID-19. *Front. Cardiovasc. Med*. 2022;9:964512. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.964512>
- Jones E.A.V. Mechanism of COVID-19-induced cardiac damage from patient, in vitro and animal studies. *Curr. Heart Fail. Rep*. 2023;20(5):451–60. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11897-023-00618-w>
- Ishisaka Y., Watanabe A., Aikawa T., et al. Overview of SARS-CoV-2 infection and vaccine associated myocarditis compared to non-COVID-19-associated myocarditis: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cardiol*. 2024;395:131401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2023.131401>
- Thaker R., Faraci J., Derti S., Schiavone J.F. Myocarditis in SARS-CoV-2: a meta-analysis. *Cureus*. 2023;15(10):e48059. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.48059>
- Liu H., Gai S., Wang X., et al. Single-cell analysis of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and spike protein priming expression of proteases

- in the human heart. *Cardiovasc. Res.* 2020;116(10):1733–41. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa191>
30. Menegale F., Manica M., Zardini A., et al. Evaluation of waning of SARS-CoV-2 vaccine-induced immunity: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw. Open.* 2023;6(5):e2310650. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.10650>
31. Paul P., El-Naas A., Hamad O., et al. Effectiveness of the pre-Omicron COVID-19 vaccines against Omicron in reducing infection, hospitalization, severity, and mortality compared to Delta and other variants: A systematic review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2023;19(1):2167410. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2167410>
32. Amir O., Goldberg Y., Mandel M., et al. Protection against Omicron BA.1/BA.2 severe disease 0–7 months after BNT162b2 booster. *Commun. Biol.* 2023;6(1):315. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04669-6>
33. Lau J.J., Cheng S.M.S., Leung K., et al. Real-world COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron BA.2 variant in a SARS-CoV-2 infection-naïve population. *Nat. Med.* 2023;29(2):348–57. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02219-5>
34. Chemaitelly H., Ayoub H.H., AlMukdad S., et al. Duration of mRNA vaccine protection against SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 subvariants in Qatar. *Nat. Commun.* 2022;13(1):3082. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30895-3>
35. Espindola O.M., Fuller T.L., de Araújo M.F., et al. Reduced ability to neutralize the Omicron variant among adults after infection and complete vaccination with BNT162b2, ChAdOx1, or CoronaVac and heterologous boosting. *Sci. Rep.* 2023;13(1):7437. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34035-9>
36. Huijberts A.J., de Gier B., Hoeve C.E., et al. Vaccine effectiveness of primary and booster COVID-19 vaccinations against SARS-CoV-2 infection in the Netherlands from July 12, 2021 to June 6, 2022: A prospective cohort study. *Int. J. Infect. Dis.* 2023;133:36–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.04.401>
37. Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Дьяков И.Н. и др. Живые аттенуированные вакцины против COVID-19: подходы к разработке и перспективы клинического применения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2023;100(3):225–36. Korchevaya E.R., Gracheva A.V., Dyakov I.N., et al. Live attenuated COVID-19 vaccines: approaches to development and prospects for clinical use. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2023;100(3):225–36. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-404>
EDN: <https://elibrary.ru/psdxzr>
38. Park H., Park M.S., Seok J.H., et al. Insights into the immune responses of SARS-CoV-2 in relation to COVID-19 vaccines. *J. Microbiol.* 2022;60(3):308–20. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-022-1598-x>
39. Rahman M.M., Masum M.H.U., Wajed S., Talukder A. A comprehensive review on COVID-19 vaccines: development, effectiveness, adverse effects, distribution and challenges. *Virusdis-ease.* 2022;33(1):1–22. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-022-00755-1>
40. Seidel A., Jacobsen E.M., Fabricius D., et al. Serum neutralizing capacity and T-cell response against the omicron BA.1 variant in seropositive children and their parents one year after SARS-CoV-2 infection. *Front. Pediatr.* 2023;11:1020865. DOI: <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1020865>
41. Guo L., Zhang Q., Zhong J., et al. Omicron BA.1 breakthrough infections in inactivated COVID-19 vaccine recipients induced distinct pattern of antibody and T cell responses to different Omicron sublineages. *Emerg. Microbes Infect.* 2023;12(1):2202263. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2202263>
42. Chen J., Yang J., Chang F., et al. Identification of broad neutralizing antibodies against Omicron subvariants from COVID-19 convalescents and vaccine recipients. *Viol. Sin.* 2023;38(2):313–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virs.2023.01.005>
43. Brown B., Ojha V., Fricke I., et al. Innate and adaptive immunity during SARS-CoV-2 infection: biomolecular cellular markers and mechanisms. *Vaccines (Basel).* 2023;11(2):408. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020408>
44. Shen J., Fan J., Zhao Y., et al. Innate and adaptive immunity to SARS-CoV-2 and predisposing factors. *Front. Immunol.* 2023;14:1159326. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1159326>
45. Miteva D., Peshevska-Sekulovska M., Snegarova V., et al. Mucosal COVID-19 vaccines: Risks, benefits and control of the pandemic. *World J. Virol.* 2022;11(5):221–36. DOI: <https://doi.org/10.5501/wjv.v11.i5.221>
46. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science.* 2020;370(6512):89–94. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
47. Zhao J., Wang L., Schank M., et al. SARS-CoV-2 specific memory T cell epitopes identified in COVID-19-recovered subjects. *Virus Res.* 2021;304:198508. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198508>
48. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;184(4):861–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
49. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K., et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep. Med.* 2021;2(2):100204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100204>
50. Trimpert J., Adler J.M., Eschke K., et al. Live attenuated virus vaccine protects against SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7 (Alpha) and B.1.351 (Beta). *Sci. Adv.* 2021;7(49):eabk0172. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk0172>
51. Altarawneh H.N., Chemaitelly H., Hasan M.R., et al. Protection against the Omicron variant from previous SARS-CoV-2 infection. *N. Engl. J. Med.* 2022;386(13):1288–90. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmc2200133>
52. Chemaitelly H., Nagelkerke N., Ayoub H.H., et al. Duration of immune protection of SARS-CoV-2 natural infection against reinfection. *J. Travel Med.* 2022;29(8):taac109. DOI: <https://doi.org/10.1093/jtm/taac109>
53. Sun K., Tempia S., Kleynhans J., et al. Rapidly shifting immunologic landscape and severity of SARS-CoV-2 in the Omicron era in South Africa. *Nat Commun.* 2023;14(1):246. DOI: [10.1038/s41467-022-35652-0](https://doi.org/10.1038/s41467-022-35652-0)
54. Yu P., Liu Z., Zhu Z., et al. Omicron variants breakthrough infection elicited higher specific memory immunity than third dose booster in healthy vaccinees. *Viol. Sin.* 2023;38(2):233–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.12.008>
55. Jacobson R.M., Poland G.A. Universal vaccination of healthy children against influenza: a role for the cold-adapted intranasal influenza vaccine. *Pediatr. Drugs.* 2002;4(1):65–71. DOI: <https://doi.org/10.2165/00128072-200204010-00007>
56. Nian X., Zhang J., Huang S., et al. Development of nasal vaccines and the associated challenges. *Pharmaceutics.* 2022;14(10):1983. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101983>

Information about the authors

Evgeny B. Faizuloev[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Applied virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; senior lecturer, Department of virology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia, faizuloev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Anastasiia V. Gracheva — researcher, Applied virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Ekaterina R. Korchevaya — junior researcher, Applied virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Yulia I. Ammour — Cand. Sci. (Biol.), Head, Oncolytic viruses laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>

Daria I. Smirnova — junior researcher, Applied virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Darya M. Khokhlova — junior researcher, Applied virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-5745-7589>

Andrey O. Drovkov — intern, Applied virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0006-3300-8078>

Andrey A. Pankratov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Department of experimental pharmacology and toxicology, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>

Galina V. Trunova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of experimental pharmacology and toxicology, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2917-4496>

Varvara A. Khokhlova — junior researcher, Department of experimental pharmacology and toxicology, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0339-2068>

Maria S. Vorontsova — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Department of experimental pharmacology and toxicology, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9320-1746>

Irina A. Leneva — D. Sci. (Biol.), Head, Experimental virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of RAS, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, Scientific director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Author contribution: *Faizuloev E.B.* — research conception, methodology, writing and editing the manuscript; *Gracheva A.V.* — research design, experiments; *Korchevaya E.R.*, *Smirnova D.I.*, *Drovkov A.O.*, *Khokhlova D.M.* — experiments, data collection, statistical analysis; *Pankratov A.A.*, *Trunova G.V.*, *Khokhlova V.A.*, *Vorontsova M.C.* — histology; *Ammour Y.I.*, *Leneva I.A.*, *Svitich O.A.*, *Zverev V.V.* — methodology, revision of the manuscript. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 05.01.2024;
accepted for publication 20.01.2024;
published 28.02.2024

Информация об авторах

Файзулов Евгений Бахтиерович — к.б.н., зав. лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; старший преподаватель кафедры вирусологии РМАНПО, Москва, Россия, faizulov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Грачева Анастасия Вячеславовна — н.с. лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Корчевая Екатерина Романовна — м.н.с. лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Аммур Юлия Игоревна — к.б.н., зав. лаб. онколитических вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0223-5738>

Смирнова Дарья Ильинична — м.н.с. лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Хохлова Дарья Михайловна — м.н.с. лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Дроков Андрей Олегович — стажер лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0006-3300-8078>

Панкратов Андрей Александрович — к.б.н., зав. отделением экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>

Трунова Галина Владимировна — к.б.н., с.н.с. отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2917-4496>

Хохлова Варвара Андреевна — м.н.с. отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0339-2068>

Воронцова Мария Сергеевна — к.б.н., м.н.с. отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9320-1746>

Ленева Ирина Анатольевна — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Медико-профилактического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; Заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Медико-профилактического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Участие авторов: *Файзулов Е.Б.* — концепция исследования, методология, написание и редактирование статьи; *Грачева А.В.* — дизайн исследования, экспериментальная часть; *Корчевая Е.Р., Смирнова Д.И., Дроков А.О., Хохлова Д.М.* — экспериментальная часть, сбор и анализ данных, визуализация; *Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Воронцова М.С.* — гистологическое исследование легких; *Аммур Ю.И., Ленева И.А., Свитич О.А., Зверев В.В.* — методология, редактирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.01.2024;
принята к публикации 20.01.2024;
опубликована 28.02.2024

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-477>

Retrospective evaluation of the results of immunodiagnosics for tuberculosis in children

Natalia A. Volkova^{1,2}, Irina V. Mikheeva^{1✉}, Albina A. Melnikova^{1,3}, Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²Moscow Hygiene and Epidemiology Center, Moscow, Russia;

³Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. For early immunodiagnosics of tuberculosis (TB) in Russia, the Mantoux test (MT) has been used for decades; since 2013, the recombinant tuberculosis antigen (RTA) test has seen widespread use.

The objective of this retrospective analytic observational cohort study was to evaluate the results of immunodiagnosics for TB in children with newly diagnosed active TB.

Materials and methods. We studied data from Russian TB institutions on the results of MT and RTA assay in children with active and inactive TB first detected in 2013–2018, as well as children with active TB first detected in Moscow in 2017–2022.

Results and discussion. In 2013–2018, out of 12,902 examined children with active TB, 11,673 (90.5%) had positive results of both skin tests and 198 (1.5%) had negative results. A negative RTA assay result with positive MT was found in 861 (6.7%) patients, and a positive RTA assay result with negative MT in 170 (1.3%). The sensitivity of the RTA assay in detecting active TB was 91.3%, while the sensitivity of MT was 97.2% ($p < 0.01$). Similar data were obtained in the same regions in 14,127 children with inactive TB: the sensitivity of MT was higher than that of the RTA assay — 97.2% versus 95.2% ($p < 0.01$). In Moscow, due to the small number of observations in 2022, it was not possible to show statistical reliability of the difference between the sensitivity of MT and RTA assay in detecting active TB in 2017–2022 (95.8% and 92.1% respectively; $p > 0.5$). For the results obtained in 2017–2021, the difference was significant ($p < 0.05$).

Conclusion. The sensitivity of MT is higher than that of the RTA assay in screening children for TB. It is recommended to use the more sensitive MT test for screening children; screening with the RTA assay will increase the number of undetected and undiagnosed cases of active TB in children. Currently, MT cannot be excluded from the algorithm of early TB diagnosis in children.

Keywords: *tuberculosis in children, tuberculin diagnostics, Mantoux test, Diaskintest, recombinant tuberculosis allergen*

Ethics approval. The study was conducted with the voluntary informed consent of the legal representatives of underage patients to use the data for scientific purposes. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 136 of 25.05.2023).

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: Volkova N.A., Mikheeva I.V., Melnikova A.A., Akimkin V.G. Retrospective evaluation of the results of immunodiagnosics for tuberculosis in children. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):52–60.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-477>

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

Оригинальное исследование

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-477>

Ретроспективная оценка результатов иммунодиагностики туберкулеза у детей

Волкова Н.А.^{1,2}, Михеева И.В.^{1✉}, Мельникова А.А.^{1,3}, Акимкин В.Г.¹

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

²Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве, Москва, Россия;

³Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Для ранней иммунодиагностики туберкулёза (ТБ) в России в течение десятилетий использовали пробу Манту (ПМ), с 2013 г. повсеместно массово применяется проба с антигеном туберкулёзным рекомбинантным (АТР).

Цель ретроспективного аналитического обсервационного когортного исследования — оценка результатов иммунодиагностики ТБ у детей с впервые выявленным активным ТБ.

Материалы и методы. Изучены данные противотуберкулёзных учреждений России о результатах ПМ и проб с АТР у впервые выявленных в 2013–2018 гг. детей с активным и неактивным ТБ, а также детей с активным ТБ, впервые выявленных в Москве в 2017–2022 гг.

Результаты и обсуждение. В 2013–2018 гг. из 12 902 обследованных детей с активным ТБ у 11 673 (90,5%) результат обеих кожных проб был положительным, у 198 (1,5%) — отрицательным. Отрицательный результат пробы с АТР при положительной ПМ установлен у 861 (6,7%) больного, а положительный результат при отрицательной ПМ — у 170 (1,3%). Чувствительность пробы с АТР при выявлении активного ТБ составила 91,3%, а ПМ — 97,2% ($p < 0,01$). Аналогичные данные получены в тех же регионах у 14 127 детей с неактивным ТБ: чувствительность ПМ оказалась выше, чем пробы с АТР, — 97,2% против 95,2% ($p < 0,01$). В Москве вследствие малого числа наблюдений в 2022 г. статистическую достоверность разности показателей чувствительности ПМ и пробы с АТР при выявлении активного ТБ в 2017–2022 гг. (95,8% против 92,1%; $p > 0,5$) показать не удалось. По результатам за 2017–2021 гг. разница оказалась достоверной ($p < 0,05$).

Заключение. Чувствительность ПМ при скрининге детей на ТБ выше, чем пробы с АТР. Для скрининга детей рекомендуется использовать более чувствительный тест-ПМ, при скрининге с использованием пробы с АТР возрастает количество пропущенных и своевременно не диагностированных случаев активного ТБ у детей. В настоящее время ПМ не может быть исключена из алгоритма ранней диагностики ТБ у детей.

Ключевые слова: туберкулез у детей, туберкулинодиагностика, проба Манту, Диаскинтест, аллерген туберкулёзный рекомбинантный

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов на использование данных в научных целях. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии (протокол № 136 от 25.05.2023).

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: Волкова Н.А., Михеева И.В., Мельникова А.А., Акимкин В.Г. Ретроспективная оценка результатов иммунодиагностики туберкулеза у детей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024;101(1):52–60.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-477>

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

Introduction

In order to control tuberculosis (TB) incidence, early diagnosis is an essential element. The importance of preventive screening for TB was particularly evident during the spread of COVID-19. It is estimated that during the 3 years of the pandemic, disruptions in active TB screening resulted in the late detection of 2011 TB patients (1.5% of the total number of TB patients first identified) [1].

Since infection with the TB pathogen usually occurs in childhood and adolescence and cases of infectious process manifestation in adults are associated with the activation of latent infection, the foundation of the early TB detection system is screening of the pediatric population. For more than a century, a clear system of TB detection in children using skin immunologic tests has been developed [2–4].

In recent decades, *in vitro* TB diagnostic methods based on quantitative determination of interferon- γ , which is released when effector T lymphocytes come into contact with specific ESAT-6 antigens, have

emerged. However, due to high specificity, these tests have significant disadvantages: high cost, dependence on the supply of imported materials, the necessity for a specially equipped laboratory and for precautions during blood collection to preserve the viability of interferon- γ -producing lymphocytes, as well as intravenous manipulations, which especially limits the use of this test in children [5, 6]. Therefore, the algorithm for diagnosing the *Mycobacterium tuberculosis* infection has not changed fundamentally, and skin diagnostic tests are still used for screening [7].

For decades, screening of children for TB has been carried out using the Mantoux test (MT); since 2009, the test with recombinant tuberculosis antigen (RTA) was carried out in certain regions, and since 2013, it has seen widespread use [8, 9].

High sensitivity and specificity of the RTA assay when used in patients with clinical and radiologic signs of respiratory TB have been shown [10–12]. However, the RTA assay may be negative in people at early stages of *M. tuberculosis* infection, in TB patients

with pronounced immunopathology disorders due to the severe course of the tuberculosis process, as well as in people with concomitant diseases accompanied by immunodeficiency state, which is especially relevant in the context of the spread of a new coronavirus infection [1, 13, 14].

A multitude of scientific papers have been devoted to the study and evaluation of the results of MT and the RTA assay [9, 11, 15]. The parameters of tuberculin diagnostics were established on a huge material (10.5 million children in Moscow for 7 years): intradermal MT with 2 TU (tuberculin units) of PPD-L (purified protein derivative modified by Linnikova). The sensitivity of the method was 94.7%, specificity — 41.7%. The probability of disease absence in case of a negative test was 99.9%. The probability of disease in a child with a positive test is 0.01% [16, 17], whereas negative reactions to RTA can be detected in persons with inactive TB infection [18, 19] and at early stages of infection with *M. tuberculosis* [19, 20].

When selecting tests for screening, sensitivity is the first factor taken into consideration. The sensitivity of a test is its ability to reliably detect the presence of a given disease in a patient. In other words, sensitive tests should not leave any patients unaccounted for, although it is almost inevitable that in certain cases the disease would be erroneously diagnosed for conditionally healthy individuals. Sensitive tests are recommended to be used in the early stages of diagnostic search to narrow its scope, when there are many possible variants and diagnostic tests will allow to exclude some of them. It should be noted that a negative result of a sensitive test is particularly informative in clinical practice [21].

Despite the differences in sensitivity and specificity of MT with 2 TU of PPD-L and RTA, which do not allow to consider these methods interchangeable, in the order of the Ministry of Health of Russia No. 951 of 29.12.2014¹, the replacement of MT with RTA for TB screening in children 8 years of age and older was approved. These recommendations contradicted the previously existing sanitary and epidemiological rules of SP 3.1.2.3114-13 "Tuberculosis Prevention"². However, certain subjects of the Russian Federation started to conduct screening using the RTA assay [20]. Against this background, TB incidence increased in subgroup IIIA and in all subgroups of group VI of the dispensary registration group (DRG), which may be due to the cancellation of preventive treatment of

children in these DRGs in case of a negative reaction to RTA [19, 20, 22].

Thus, the experience of the widespread use of the RTA assay accumulated over a decade must be objectively analyzed and evaluated, as there is still no consensus among specialists (phthisiatrists, pediatricians, epidemiologists) about the advisability of its use as an alternative to MT [7, 18–20, 22].

In this regard, a study was conducted to retrospectively evaluate the results of immunodiagnostics for TB in children with newly diagnosed active TB using MT and the RTA assay.

Materials and methods

A retrospective analytical observational cohort study was conducted. The materials for the study were the data received by Rospotrebnadzor from TB institutions in the federal subjects of Russia in accordance with the request No. 01/5300-15-27 of 18.05.2015 "On submission of information on TB screening of children" and Rospotrebnadzor letter No. 01/7238-15-27 of 06.06.2017 "On the results of the study of the comparative effectiveness of the Mantoux test (MT) and the test with recombinant tuberculosis allergen (RTA)". The data included information on the results of MT with 2 TU of PPD-L and the test with RTA in pediatric patients with newly diagnosed active and inactive TB in 2013–2018. The inactive form of the disease was considered to be TB in children registered in the III DRG (persons with clinically cured TB, with large and small residual changes)³. Furthermore, we analyzed the results of immunodiagnostics using MT and Diaskintest in child and adolescent patients (0–17 years old) with active TB in Moscow in 2018–2022 according to the data obtained from TB institutions of the city. The study was conducted with the voluntary informed consent of the legal representatives of underage patients to use the data for scientific purposes. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 136 of 25.05.2023).

Statistical processing of the results was carried out using parametric statistics methods with determination of the standard error of the relative value. Reliability of differences between the relative values compared was assessed using Student's t-criterion. The difference in results was considered statistically significant at $p < 0.05$.

¹ Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of December 29, 2014, No. 951 "On Approval of Methodological Recommendations to Improve Diagnosis and Treatment of Respiratory Tuberculosis".

² Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation from 22.10.2013 № 60 (ed. from 14.09.2020) "On approval of sanitary and epidemiological rules SP 3.1.2.3114-13 "Tuberculosis Prevention" (together with "SP 3.1.2.3114-13...")".

³ Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 21.03.2003 No. 109 "On improvement of anti-tuberculosis measures in the Russian Federation"; Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 13.03. 2019 No. 127n "On Approval of the procedure for dispensary monitoring of tuberculosis patients, persons who are or have been in contact with the source of tuberculosis, as well as persons suspected of tuberculosis and cured of tuberculosis and invalidation of paragraphs 16-17 of the Procedure for the provision of medical care to tuberculosis patients, approved by Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of November 15, 2012 No. 932n".

Table 1. Results of MT and RTA assay in newly diagnosed active pediatric TB patients in 2013–2018

Year	Total children with newly diagnosed active tuberculosis	Of these with the results of the Mantoux test with 2 TE (MT) and the test with RTA							
		MT+ RTA–		MT+ RTA+		MT– RTA–		MT– RTA+	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2013	4128	290	7,03	3750	90,84	46	1,11	42	1,02
2014	3850	261	6,78	3487	90,57	46	1,20	56	1,45
2015	1582	54	3,4	1485	93,5	32	2	11	0,7
2016	2435	232	9,3	2087	83,3	57	2,28	59	2,36
2017	522	12	2	502	82,6	7	1,2	1	0,2
2018	385	12	2,5	362	75,7	10	2,1	1	0,2
Total	12 902	861	6,7	11 673	90,5	198	1,5	170	1,3

Note. Here and in the Tables 2 and 3: "+" — positive result; "-" — negative result.

Results

According to data from TB institutions, 12,902 children were diagnosed with active TB for the first time in 2013–2018⁴.

The absolute majority of patients ($n = 11,673$; 90.5%) were positive for both skin tests (**Table 1**). In 198 (1.5%) children with active TB, both samples were negative. A negative result of the RTA assay with positive MT was found in 861 (6.7%) patients, and a positive result with negative MT in 170 (1.3%). Consequently, the sensitivity of RTA assay in detecting active TB was 91.3% and the sensitivity of MT was 97.2% ($p < 0.01$). For 2013–2018, in 1059 children with newly diagnosed active TB, the RTA assay showed a negative result. Consequently, abandoning MT and switching to RTA screening will increase the number of undetected and undiagnosed cases of active TB in children.

Similar data were obtained when analyzing the results of skin tests in children with newly diagnosed inactive TB in the same regions of Russia in 2014–2018 (**Table 2**). The absolute majority of patients ($n = 12,953$; 91.7%) had positive results of both skin tests, 101 (0.7%) children had negative results. A negative result of the test with RTA in case of positive MT was detected in 775 (5.5%) patients, a positive result of the test with RTA in case of negative MT — in 495 (3.5%). Thus, in the detection of inactive TB, the sensitivity of MT was higher than that of the RTA assay and amounted to 97.2%, while the sensitivity of the RTA assay was 95.2% ($p < 0.01$). During 2014–2018, in 876 children with newly diagnosed inactive TB, the RTA assay was negative. Consequently, abandoning MT and switching to screening using the RTA assay will increase the number of undetected and undiagnosed cases of inactive TB in children in a timely manner.

Due to the cancellation of using the MT method on children over 7 years of age in 2018⁵, it became impossible to continue the study nationwide. However, thanks to the data obtained from TB institutions in the capital, we were able to retrospectively evaluate the results of immunodiagnostics using MT and RTA assay in children and adolescents (0–17 years of age) with active TB in Moscow in 2017–2022.

A total of 515 cases of active TB in children were reported over 6 years, and 447 cases were reported in the epidemiologic investigation. Both skin tests were performed only in 240 people, which made comparative analysis difficult. Of the 240 children with active TB, 217 (90.4%) had a positive result of MT and RTA, while 6 (2.5%) were negative (**Table 3**). A positive result of tuberculin diagnostics with a negative test with RTA was obtained in 13 (5.4%) children. The test with RTA was negative in children diagnosed with focal, infiltrative pulmonary and intrathoracic lymph nodes TB. A positive result of the RTA assay with negative MT was recorded only in 4 (1.7%) children. Despite the fact that the sensitivity of MT in detecting active TB was higher than that of the RTA assay (95.8% and 92.1% respectively), statistical reliability of the difference between these indicators could not be demonstrated due to the small number of observations in 2022 (only 17 cases with the results of both tests). If we analyze the data for 2017–2021, the difference in the sensitivity of MT and RTA assay is significant ($p < 0.05$).

Discussion

The results of this analysis confirmed previously published data that the RTA assay can give false-negative results at the early stages of infection with *M. tuberculosis* and at the initial stage of TB process development, which, unlike MT, does not allow for the full

⁴ Data were obtained from 57–81 subjects of the Russian Federation in different years.

⁵ See: Screening examination of children and adolescents to detect tuberculosis infection: methodological guide. M.; 2018. p. 48

Table 2. Results of MT and RTA assay in newly diagnosed inactive pediatric TB patients in 2014–2018

Year	Total children with newly diagnosed inactive tuberculosis	Of these with the results of the Mantoux test with 2TE (MT) and the test with RTA							
		MT+ RTA–		MT+ RTA+		MT– RTA–		MT– RTA+	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2014	2421	188	7,77	2170	89,63	22	0,91	41	1,69
2015	3002	157	5,23	2759	91,91	26	0,87	60	2
2016	2819	139	4,5	2862	92,8	17	0,6	66	2,1
2017	3090	175	5,7	2 654	85,9	16	0,5	218	7,1
2018	2795	116	4,2	2 508	89,7	20	0,7	110	3,9
Total	14 127	775	5,5	12 953	91,7	101	0,7	495	3,5

Table 3. Results of MT and RTA assay in newly diagnosed active TB patients in Moscow in 2017–2022

Year	Total children with newly diagnosed active tuberculosis	Of these with the results of the Mantoux test with 2TE (MT) and the test with RTA							
		MT+ RTA–		MT+ RTA+		MT– RTA–		MT– RTA+	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2017	68	5	7,4	60	88,2	1	1,5	2	2,9
2018	48	3	6,3	43	89,6	1	2,1	1	2,1
2019	47	2	4,3	45	95,7	0	0	0	0
2020	22	1	4,5	20	90,9	1	4,5	0	0
2021	38	2	5,3	35	92,1	1	2,6	0	0
2022	17	0	0	14	82,4	2	11,8	1	5,9
Bcero Total	240	13	5,4	217	90,4	6	2,5	4	1,7

formation of risk groups, detection of the disease at the early stages of its development and increases the probability of not detecting the disease [22, 23].

Even at the stage of RTA drug approbation, its researchers [24] observed only 84.2% (95% CI 79.7–88.8) of positive results of this test in patients with active TB, and 94.5% (95% CI 83.0–97.9) in children and adolescents ($n = 200$) with active respiratory TB after the first phase of chemotherapy. Moreover, the response to MT was positive in all 200 children in this subgroup. It should be noted that the authors concluded on the basis of these quantitative data that the sensitivity of MT and the RTA assay were the same, despite the statistically significant difference in sensitivity ($p < 0.05$) [24].

A number of researchers have observed a negative reaction to the RTA assay in 13–20% of children with TB, including those with secondary forms of TB and disseminated processes, including cases with bacterial excretion [9, 15, 20, 25, 26].

Similar data were obtained by Y.A. Yarova et al. [19], who noted that TB in children with negative results of the RTA assay persisted in complicated forms of the primary period in $45.5 \pm 15.0\%$ of cases, uncom-

plicated forms — in $27.3 \pm 13.4\%$ of cases, generalized lesions — in $27.3 \pm 13.4\%$ of cases.

According to other data, among children with TB with negative reactions to RTA administration, patients with active forms of TB accounted for 20.4%. M.E. Lozovskaya et al. emphasized that mass tuberculin diagnostics is the leading method of detecting patients with negative results of the RTA assay, thanks to which TB was diagnosed in $70.4 \pm 8.8\%$ of cases, in children with residual post-tuberculosis changes — in $93.8 \pm 4.7\%$ of cases [23].

According to a large-scale retrospective observational study in 65 regions of the Russian Federation [27], the rate of positive reactions to RTA administration in children with active TB in the first DRG was more than 90% (92.1% in 2010, 90.1% in 2011, and 92.8% in 2012), which is almost identical to the results of the present study.

A meta-analysis of published results of the RTA assay over 10 years also showed that the proportion of positive reactions of the RTA assay in children with TB up to 14 years of age was lower (93.5%) compared to MT, which showed positive results in 97.9% of cas-

es ($p = 0.688$) [28]. At the same time, in most studies of the RTA assay and according to clinical guidelines [29], children with positive results were subjected to computed tomography (CT), so the sensitivity of the RTA assay was equal to that of CT, while children with suspected TB based on MT results were not referred to CT until they were positive for RTA [24, 30–32]. Furthermore, according to the instructions for Diaskintest, not only positive but also questionable and doubtful reactions to the RTA assay are subject to TB screening⁶. However, despite all the regulatory measures initially taken to increase the sensitivity of the RTA test for TB detection, the results of its use in practice have shown that its sensitivity is inferior to that of MT.

According to our preliminary estimates, in Russia as a whole, the number of undetected cases of active TB in children would be about 300 per year if the country switched to screening with only the RTA assay [33]. Therefore, in the algorithm of TB detection and diagnosis, the RTA assay and MT cannot be interchangeable and complement each other. MT is able to determine the presence of infection with *M. tuberculosis* and include the patient in the TB risk group, has a wide range of

diagnostic capabilities in dynamics. The RTA assay has diagnostic value and demand in TB risk groups (contact, change of sensitivity to MT, social prerequisites, diseases with similar clinical and radiologic picture) [22].

Conclusion

1. In 6.2–7.9% of children with newly diagnosed active TB, the RTA assay was negative, while a negative MT result was detected in only 2.8–4.2% of them, i.e. the sensitivity of MT in screening children for TB is higher than that of the RTA assay. Between 2013 and 2018, in 1059 children with newly diagnosed active TB, the RTA assay was negative. Consequently, abandoning MT and switching to RTA screening will increase the number of undetected and undiagnosed cases of active TB in children.

2. A negative RTA assay result with a positive MT result cannot be a guarantee that a child does not have active TB, including bacteriuria, and requires additional testing.

3. For TB screening of children, MT should be used as a more sensitive test. As of now, MT cannot be excluded from the algorithm of early TB diagnosis in children and adolescents.

⁶ Diaskintest. URL: <http://www.diaskintest.ru>

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Михайлова Ю.В., Стерликов С.А., Михайлов А.Ю. Оценка последствий влияния пандемии COVID-19 на систему активного выявления случаев туберкулеза в Российской Федерации. *Социальные аспекты здоровья населения*. 2023;69(4):1. Mikhaylova Yu.V., Sterlikov S.A., Mikhaylov A.Yu. Assessing the impact of the COVID-19 pandemic on the system of active tb detection in the Russian Federation. *Social Aspects of Population Health*. 2023;69(4):1. DOI: <https://doi.org/10.21045/2071-5021-2023-69-6-1>
2. Слогоцкая Л.В. Кожные иммунологические пробы при туберкулезе — история и современность. *Туберкулез и болезни легких*. 2013;90(5):039–47. Slogotskaya L.V. Immunological skin test in tuberculosis — history and the present. 2013;90(5):039–47. EDN: <https://elibrary.ru/rkscab>
3. Овсянкина Е.С., Губкина М.Ф., Панова Л.В., Юхименко Н.В. Анализ эффективности кожных туберкулиновых проб для диагностики туберкулезной инфекции у детей и подростков. *Вопросы практической педиатрии*. 2015;10(5):36–43. Ovsyankina E.S., Gubkina M.F., Panova L.V., Yukhimenko N.V. Analysis of the effectiveness of tuberculin skin tests for diagnosing tuberculosis infection in children and adolescents. *Clinical Practice in Pediatrics*. 2015;10(5):36–43. EDN: <https://elibrary.ru/unrndx>
4. Михеева И.В., Бурдова Е.Ю. Ранняя диагностика туберкулеза у детей на современном этапе. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2016;95(3):135–9. Mikheeva I.V., Burdova E.Y. Early diagnosis of tuberculosis in children at the modern stage. *Pediatric. Journal named after G.N. Speransky*. 2016;95(3):135–9. EDN: <https://elibrary.ru/vxnjnj>
5. Аксенова В.А., Барышникова Л.А., Клевно Н.И., Кудлай Д.А. Скрининг детей и подростков на туберкулезную инфекцию в России — прошлое, настоящее, будущее. *Туберкулез и болезни лёгких*. 2019;97(9):59–66. Akseanova V.A., Baryshnikova L.A., Klevno N.I., Kudlay D.A. Screening for tuberculosis infection in children and adolescents in Russia — past, present, future. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019;97(9):59–66. DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-9-59-67> EDN: <https://elibrary.ru/upzyub>
6. Слогоцкая Л.В., Иванова Д.А., Кочетков Я.А. и др. Сравнительные результаты кожного теста с препаратом, содержащим рекомбинантный белок CFP-10-ESAT-6, и лабораторного теста QuantiFERON. Совершенствование медицинской помощи больным туберкулезом. В кн.: *Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Совершенствование медицинской помощи больным туберкулезом»*. СПб.;2011:379–81. Slogotskaya L.V., Ivanova D.A., Kochetkov Ya.A., et al. Comparative results of a skin test with a drug containing the recombinant protein CRP-10-ESAT-6 and a laboratory test QuantiFERON. Improving medical care for tuberculosis patients. In: *Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference «Improving Medical Care for Tuberculosis Patients»*. St. Petersburg;2011:379–81.
7. Бородулина Е.А. Скрининг туберкулезной инфекции. Современное состояние проблемы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(1):28–33. Borodulina E.A. Screening for TB infection. State of the problem. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(1):28–33. EDN: <https://elibrary.ru/vldhph>
8. Старшинова А.А., Довгалоук И.Ф., Яблонский П.К. Иммунодиагностика туберкулеза: десятилетний опыт применения иммунологических тестов в России. *Туберкулез и болезни легких*. 2019;97(5):58–65. Starshinova A.A., Dovgalyuk I.F., Yablonskiy P.K. Immunodiagnosics of tuberculosis: 10-year experience of using immunological tests in Russia. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019;97(5):58–65. DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-5-58-65> EDN: <https://elibrary.ru/nujntk>
9. Слогоцкая Л.В., Богородская Е.М., Леви Д.Т., Сельцовский П.П. 10 лет кожной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) и 110 лет туберкулиновой пробе Манту — сравнение эффективности. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(2):67–77. Slogotskaya L.V., Bogorodsakaya E.M., Levi D.T., Seltsovsky P.P. Comparison of efficacy of Diaskintest®, a skin test with a recombinant tuberculosis allergen, used for 10 years and Mantoux tuberculin sensitivity test used for 110 years. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(2):67–77. EDN: <https://elibrary.ru/zgvtowl>
10. Киселев В.И., Барановский П.М., Пупышев С.А. и др. Новый кожный тест для диагностики туберкулеза на основе рекомбинантного белка ESAT-CFP. *Молекулярная медицина*. 2008;(4):28–35. Kiselev V.I., Baranovsky P.M., Pupyshov S.A., et al. Novel recombinant protein ESAT-CFP-based skin test for the diagnosis of tuberculosis. *Molecular Medicine*. 2008;(4):28–35. EDN: <https://elibrary.ru/juzfir>
11. Кудлай Д.А., Старшинова А.А., Довгалоук И.Ф. Аллерген туберкулезный рекомбинантный: 10-летний опыт применения теста у детей и подростков в Российской Федерации (данные метаанализа). *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2020;99(3):121–9. Kudlay D.A., Starshinova A.A., Dovgalyuk I.F. Recombinant tuberculosis allergen: 10 years of experience with the test in children and adolescents in the Russian Federation (metaanalysis data). *Pediatric. Journal named after G.N. Speransky*. 2020;99(3):121–9. DOI: <https://doi.org/10.24110/0031-403X-2020-99-3-121-129> EDN: <https://elibrary.ru/xoqftu>
12. Сметанин А.Г. Прогностическое значение пробы Манту и Диаскинтеста при туберкулезной инфекции у детей. *Медицинский алфавит*. 2013;2(13):38–41. Smetanin A.G. Prognostic value of Mantoux test and Diaskintest in tuberculosis infection in children. *Medical Alphabet*. 2013;2(13):38–41. EDN: <https://elibrary.ru/rloezx>
13. Красильников И.В. Современные методы массовой ранней диагностики туберкулезной инфекции. *Медицинский алфавит*. 2013;1(6):33–5. Krasil'nikov I.V. Modern methods of mass early diagnosis of tuberculosis infection. *Medical Alphabet*. 2013;1(6):33–5. EDN: <https://elibrary.ru/rmxjje>
14. Старшинова А.А., Малкова А.М., Старшинова А.А. и др. Туберкулез в условиях новой коронавирусной инфекции. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2021;100(2):105–9. Starshinova A.A., Malkova A.M., Starshinova A.A., et al. Tuberculosis under conditions of novel coronavirus infection. *Pediatric. Journal named after G.N. Speransky*. 2021;100(2):105–9. DOI: <https://doi.org/10.24110/0031-403X-2021-100-2-153-157> EDN: <https://elibrary.ru/eanetr>
15. Михеева И.В., Бурдова Е.Ю., Мельникова А.А. Сравнительная оценка результатов применения различных методов аллергодиагностики туберкулеза у детей. *Медицинский алфавит*. 2017;2(18):21–3. Mikheeva I.V., Burdova E.Yu., Melnikova A.A. Comparative evaluation of results of various methods of allergodiagnosis of tuberculosis in children. *Medical Alphabet*. 2017;2(18):21–3. EDN: <https://elibrary.ru/zvmnan>
16. Мейснер А.Ф., Овсянкина Е.С., Стахеева Л.Б. Выявление туберкулеза у подростков в Москве. *Туберкулез и болезни легких*. 2009;86(1):40–4. Meisner A.F., Ovsyankina Ye.S., Stakheyeva L.B. Detection of tuberculosis in Moscow adolescents. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2009;86(1):40–4. EDN: <https://elibrary.ru/kxdeez>
17. Мейснер А.Ф., Овсянкина Е.С., Стахеева Л.Б. Туберкулинодиагностика у детей. Скрытая (латентная) туберкулезная инфекция? *Проблемы туберкулеза и болезни*

- легких. 2008;85(6):29–33. Meysner A.F., Ovsyankina E.S., Stakheeva L.B. Tuberculin diagnostics in children. Latent tuberculosis infection? *Problems of Tuberculosis and Lung Diseases*. 2008;85(6):29–33. EDN: <https://elibrary.ru/mwdexp>
18. Шилова М.В. Туберкулез в России в 2012–2013 году. M.;2014. Shilova M.V. *Tuberculosis in Russia in 2012–2013*. Moscow;2014. EDN: <https://elibrary.ru/wecjvl>
19. Яровая Ю.А., Лозовская М.Э., Клочкова Л.В. и др. Туберкулезная инфекция у детей с отрицательными реакциями на пробу Диаскинтест. *Педиатр*. 2019;10(3):37–44. Yarova Yu.A., Lozovskaya M.E., Klochkova L.V., et al. Tuberculosis infection in children with negative reactions to the Diaskintest. *Pediatrician (St. Petersburg)*. 2019;10(3):37–44. DOI: <https://doi.org/10.17816/PED10337-44> EDN: <https://elibrary.ru/ojfbxd>
20. Покровский В.И., Брико Н.И., ред. *Руководство к практическим занятиям по эпидемиологии инфекционных болезней*. М.;2007. Pokrovsky V.I., Briko N.I., eds. *A Guide for Practical Training in the Epidemiology of Infectious Diseases*. Moscow;2007.
21. Овсянкина Е.С., Губкина М.Ф., Панова Л.В., Юхименко Н.В. Кожные иммунологические тесты для диагностики туберкулезной инфекции у детей и подростков (аналитический обзор). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(2):26–33. Ovsyankina E.S., Gubkina M.F., Panova L.V., Yukhimenko N.V. Cutaneous immunological tests for the diagnosis of tuberculosis infection in children and adolescents (analytical review). *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(2):26–33. EDN: <https://elibrary.ru/xgvbybt>
22. Лозовская М.Э., Белушков В.В., Гурина О.П. и др. Сопоставление лабораторных тестов Quantiferon, Тубинферон и Диаскинтеста у детей с туберкулезной инфекцией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;(12):838–42. Lozovskaya M.E., Belushkov V.V., Gurina O.P., et al. The comparison of laboratory tests Quantiferon, Tubinferon and Diaskintest in children with tuberculosis infection. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;(12):838–42. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-838-842> EDN: <https://elibrary.ru/xscfsd>
23. Слогоцкая Л.В. *Эффективность кожного теста с аллергеном туберкулёзным, содержащим рекомбинантный белок CFP10-ESAT6, в диагностике, выявлении и определении активности туберкулёзной инфекции*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.;2011. Slogotskaya L.V. *The effectiveness of a skin test with a tuberculosis allergen containing the recombinant protein CFP10-ESAT6 in the diagnosis, detection and determination of the activity of tuberculosis infection*: Diss. Moscow;2011. EDN: <https://elibrary.ru/qfntsx>
24. Губкина М.Ф., Овсянкина Е.С., Ершова Н.Г. и др. Новые технологии в диагностике туберкулеза у детей из групп риска. *Туберкулез и болезни легких*. 2011;88(4):112. Gubkina M.F., Ovsyankina E.S., Ershova N.G., et al. New technologies in the diagnosis of tuberculosis in children at risk. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2011;88(4):112. EDN: <https://elibrary.ru/nwvxod>
25. Аксенова В.А., Барышникова Л.А., Клевно Н.И. и др. Актуальные вопросы скрининга детей на туберкулез. *Туберкулез и болезни легких*. 2013;90(6):007–8. Aksenova V.A., Baryshnikova L.A., Klevno N.I., et al. Current issues of screening children for tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2013;90(6):007–8. EDN: <https://elibrary.ru/rkbtv>
26. Аксенова В.А., Леви Д.Т., Александрова Н.В. и др. Туберкулез у детей: современные методы профилактики и ранней диагностики. *Доктор.Ру*. 2017;(15):9–15. Aksenova V.A., Levi D.T., Aleksandrova N.V., et al. Pediatric TB: modern methods for prevention and early diagnostics. *Doctor.Ru*. 2017;(15):9–15. EDN: <https://elibrary.ru/yrumgl>
27. Аксенова В.А., Клевно Н.И., Барышникова Л.А. и др. Выявление и тактика диспансерного наблюдения за лицами из групп риска с использованием рекомбинантного туберкулезного антигена — Диаскинтест: методические рекомендации (протокол № 4 от 08.06.2011). М.;2011. Aksenova V.A., Klevno N.I., Baryshnikova L.A., et al. *Identification and tactics of dispensary observation of persons at risk using recombinant tuberculosis antigen — Diaskintest: methodological recommendations* (protocol No. 4 of 06/08/2011).
28. Старшинова А.А. *Туберкулез у детей из семейного очага инфекции (диагностика, клиническое течение и профилактика)*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. СПб.;2013. Starshinova A.A. *Tuberculosis in children from the family focus of infection (diagnosis, clinical course and prevention)*: Diss. St. Petersburg;2013. EDN: <https://elibrary.ru/zostjt>
29. Вилк В.В., Писаренко Н.К., Кульчицкая С.С., Александров С.М. Компьютерная томография в диагностике туберкулеза у детей. *Туберкулез и болезни легких*. 2011;88(4):84–5. Vilk V.V., Pisarenko N.K., Kul'chitskaya S.S., Aleksandru S.M. Computed tomography in the diagnosis of tuberculosis in children. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2011;88(4):84–5. EDN: <https://elibrary.ru/nwvxar>
30. Аксенова В.А., Клевно Н.И., Барышникова Л.А. *Выявление и диагностика туберкулеза у детей, поступающих и обучающихся в образовательных организациях: Клинические рекомендации*. М.;2021. Aksenova V.A., Klevno N.I., Baryshnikova L.A. *Detection and Diagnosis of Tuberculosis in Children Enrolled and Studying in Educational Institutions: Clinical Recommendations*. Moscow;2021. EDN: <https://elibrary.ru/ayzgf>
31. Михеева И.В., Бурдова Е.Ю., Мельникова А.А. Сравнительная оценка методов алергодиагностики туберкулеза у детей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(3):41–4. Mikheeva I.V., Burdova E.Yu., Melnikova A.A. Comparative evaluation of allergodiagnostic of tuberculosis in children. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016;15(3):41–4. EDN: <https://elibrary.ru/wclzbx>

Information about the authors

Natalia A. Volkova — junior researcher, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Deputy Chief Physician, Center for Hygiene and Epidemiology in Moscow, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0292-8326>

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>

Albina A. Melnikova — researcher, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; Head, Department of epidemiological human welfare, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>

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

Author contribution: *Volkova N.A.* — collection and processing of material, statistical processing, text writing; *Volkova N.A.*, *Melnikova A.A.* — organization of collection and processing of clinical material; *Mikheeva I.V.*, *Akimkin V.G.* — concept and design of the study, editing.

The article was submitted 18.12.2023;
accepted for publication 12.02.2024;
published 28.02.2024

Информация об авторах

Волкова Наталья Александровна — м.н.с. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; заместитель главного врача Центра гигиены и эпидемиологии в г. Москве, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0292-8326>

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>

Мельникова Альбина Андреевна — н.с. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; начальник Управления эпидемиологического благополучия человека Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>

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

Участие авторов: *Волкова Н.А.* — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; *Волкова Н.А.*, *Мельникова А.А.* — организация сбора и обработки клинического материала; *Михеева И.В.*, *Акимкин В.Г.* — концепция и дизайн исследования, редактирование.

Статья поступила в редакцию 18.12.2023;
принята к публикации 12.02.2024;
опубликована 28.02.2024



Hepatitis B virus preCore/Core region variability in pregnant women in the Republic of Guinea

Yulia V. Ostankova^{1✉}, Thierno A.L. Balde², Sanaba Boumbaly³, Elena N. Serikova¹, Elena B. Zueva¹, Diana E. Reingardt¹, Alexandr N. Schemelev¹, Vladimir S. Davydenko¹, Ekaterina V. Anufrieva¹, Elena V. Esaulenko¹, Areg A. Totolian¹

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

²Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

³Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée, Nzerecore, Republic of Guinea

Abstract

Introduction. The vertical route of hepatitis B virus (HBV) transmission is a significant problem in African countries, which is characterized by late diagnosis of the disease and high mortality. The high prevalence of hepatocellular carcinoma (HCC) in Africa may be due to variability in the HBV preCore/Core region, mutations in which contribute to disease progression. Molecular genetic characterization of strains circulating among pregnant women may reflect the overall mutational profile of the pathogen in the population.

The objective of this study was to analyze the variability of the HBV preCore/Core region circulating among pregnant women in the Republic of Guinea.

Materials and methods. The study material included 480 plasma samples obtained from HBV-positive pregnant women from the Republic of Guinea. For all samples, the nucleotide sequences of the preCore/Core region of the HBV genome were sequenced and analyzed.

Results. Amino acid variability in the preCore region was determined in 211 (43.96%), and in the Core region in 473 (98.54%) patients. 12 polymorphic sites of the preCore region were identified in which amino acid substitutions occurred, including 8, 2 and 5 positions identified for genotypes E, A and D, respectively. In the Core region, 67 substitution positions were identified, including 46 in samples of genotype E, 23 in HBV genotype A and 26 in genotype D. It was shown that the distribution of substitutions in the preCore and Core regions in HBV genotypes E, A and D differs significantly with a predominance in mutations among HBV genotype E — $p < 0.0001$. Individual characteristic mutations have been identified for each genotype. The most common clinically significant mutations in the preCore/Core region in the study group were identified, including pc-H5D (27,08%), pc-W28* (35,21%), c-E64D (33,54%), c-L116I/V/G (91,46%), c-T146N (73,13%). The double mutation A1762T/G1764A in the basal core promoter was shown in 74 samples of HBV genotype E, which accounted for 15.42% of the total group and 16.59% of patients with HBV genotype E.

Conclusion. The frequency of clinically significant preCore/Core mutations among pregnant women in the Republic of Guinea was determined. The data obtained reflect their prevalence in the general population and can be used to predict the progression of chronic HBV among the region's population.

Keywords: hepatitis B virus, occult hepatitis B, HBV variability, genotypes, clinically significant mutations, preCore/Core, laboratory diagnostics

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health of the Republic of Guinea (protocol No. 129/CNERS/16, August 31, 2015).

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: Ostankova Yu.V., Balde T.A.L., Boumbaly S., Serikova E.N., Zueva E.B., Reingardt D.E., Schemelev A.N., Davydenko V.S., Anufrieva E.V., Esaulenko E.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus preCore/Core region variability in pregnant women in the Republic of Guinea. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024; 101(1):61–71.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-447>

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

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-447>

Вариабельность preCore/Core-региона вируса гепатита В у беременных женщин в Гвинейской Республике

Останкова Ю.В.^{1✉}, Бальде Т.А.Л.², Бумбали С.³, Серикова Е.Н.¹, Зуева Е.Б.¹, Рейнгардт Д.Э.¹, Щемелев А.Н.¹, Давыденко В.С.¹, Ануфриева Е.В.¹, Эсауленко Е.В.¹, Тотолян Арег А.¹

¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия;

²Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика;

³Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинее, Нзерекоре, Гвинейская Республика

Аннотация

Актуальность. Вертикальный путь передачи вируса гепатита В (ВГВ) является одним из наиболее значимых в странах Африки, для которых характерны позднее выявление заболевания и высокая смертность. Причиной высокой распространённости гепатоцеллюлярной карциномы в Африке может быть вариативность preCore/Core-региона ВГВ, мутации в котором способствуют прогрессированию заболевания. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов, циркулирующих среди беременных женщин, может отражать общий мутационный профиль патогена в популяции.

Целью нашей работы был анализ вариабельности preCore/Core-региона ВГВ, циркулирующего среди беременных женщин в Гвинейской Республике.

Материалы и методы. Исследовали 480 образцов плазмы, полученных от ВГВ-положительных беременных женщин из Гвинейской Республики. Для всех образцов проводили секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей preCore/Core-региона генома ВГВ.

Результаты. Аминокислотная изменчивость в preCore-регионе определена у 211 (43,96%) пациенток, в Core-регионе — у 473 (98,54%). Выявлены 12 полиморфных участков preCore-региона, в которых происходили аминокислотные замены, в том числе для генотипов E, A и D определены 8, 2 и 5 позиций соответственно. В Core-регионе определены 67 позиций замен, в том числе 46 в образцах генотипа E, 23 — генотипа A, 26 — генотипа D. Распределение замен в preCore- и Core-регионах у ВГВ-генотипов E, A и D значительно отличается с преобладанием мутаций среди генотипа E ($p < 0,0001$). Для каждого генотипа определены индивидуальные характерные мутации. Выявлены наиболее распространённые клинически значимые мутации в preCore/Core-регионе в обследуемой группе, в том числе pс-H5D (27,08%), pс-W28* (35,21%), с-E64D (33,54%), с-L116I/V/G (91,46%), с-T146N (73,13%). Двойная мутация A1762T/G1764A в базальном ядерном промоторе показана в 74 образцах генотипа E, что составило 15,42% от общей группы и 16,59% от пациентов с генотипом E.

Заключение. Определена частота встречаемости клинически значимых мутаций preCore/Core среди беременных женщин Гвинейской Республики. Полученные данные отражают их распространённость в общей популяции и могут быть использованы для прогноза прогрессирования хронического гепатита В среди населения данного региона.

Ключевые слова: вирус гепатита В, скрытый гепатит В, вариабельность ВГВ, генотипы, клинически значимые мутации, preCore/Core, лабораторная диагностика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. На проведение данного этапа работы было получено согласие Национального комитета по этике Министерства здравоохранения Гвинейской Республики (протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015).

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: Останкова Ю.В., Бальде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Рейнгардт Д.Э., Щемелев А.Н., Давыденко В.С., Ануфриева Е.В., Эсауленко Е.В., Тотолян Арег А. Вариабельность preCore/Core-региона вируса гепатита В у беременных женщин в Гвинейской Республике. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;101(1):61–71.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-447>

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

Introduction

Hepatitis B virus (HBV), which is capable of causing both acute and chronic liver disease and is the seventh leading cause of death worldwide, remains a serious public health problem despite all measures taken for its elimination. According to various researchers, the number of patients chronically infected with HBV in the world amounts to 360 million people¹. More than 75 million of them live in sub-Saharan Africa, where the population prevalence of the HBV surface antigen (HBsAg), the main laboratory diagnostic marker, exceeds 8% and in some regions it could even reach 25% [1]. Natural routes of transmission include sexual (direct sexual contact), vertical (from mother to fetus during or after childbirth), as well as prenatal (transplacental) infection, and transmission due to household contacts, including direct and indirect, including sharing hygiene items and similar methods of contact with an infected person. One of the most significant routes of HBV transmission in Africa is vertical transmission [2]. Without therapeutic intervention, the incidence of mother-to-child transmission exceeds 31% [3]. The particular importance of early infection is due to the fact that when infected before the age of 5 years, the vast majority of cases develop chronic HBV [4]. Furthermore, early HBV infection is one of the most significant risk factors for liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC) development [5]. Another reason for the huge number of HCC patients and the high mortality rate in Africa is the late diagnosis of the disease and the consequent late referral of patients to health facilities [6]. The most affected country is Gambia, followed by the Republic of Guinea, Liberia and Sierra Leone [7]. This is due to both insufficient coverage with diagnostics and very low public awareness of viral hepatitis, routes of transmission and the consequences of infection. In addition to social factors, viral factors can influence the progression of the disease. Thus, a high viral load and active viral replication as a result of that increases the risk of LC and HCC, but even a viral load of less than 200 IU/ml does not exclude disease progression [8]. The high heterogeneity of the virus, for which 10 genotypes and more than 40 sub-genotypes are currently described, also has an impact on disease progression [9, 10]. For example, HBV subgenotype C2 is characterized by more frequent chronicity and severe disease course, including the development of HCC, than B2, and viruses of genotypes A and B are more sensitive to therapy than D and C [11].

However, the genotypic factor is not the only parameter contributing to disease progression; natural and selective viral mutations also play a major role. With the exception of rare deletions, most mutations in the preCore/Core region are point mutations, mainly asso-

ciated with decreased HBeAg levels and/or decreased viral load. Moreover, in the Core region, mutations are localized mainly in the immunogenic regions (MHC classes I + II) and thus may influence disease progression. For example, mutations in the preCore region (*G1896A*) and in the basal core promoter (BCP) — *T1753C*, *A1762T/G1764A*, amino acid substitutions in the Core region — *F24Y*, *E64D*, *E77Q*, *A80I/T/V*, *L116I*, *E180A* — are known to be associated with a severe course of liver disease and development of HCC [12]. Molecular genetic variation in viruses may show links to spatial and temporal variation, i.e. evolution over time, spread in geographic regions, at-risk groups, key populations, changes in transmission routes [13]. Therefore, dynamic monitoring of circulating virus variants in population groups reflecting the situation in the population and potentially capable of spreading the pathogen is quite important for predicting the epidemiological situation. Pregnant women are a group which fit that category, as they demonstrate the epidemiological profile of the sexually mature heterosexual population of a particular geographical region under study.

The Republic of Guinea, a country of more than 13.6 million people on the Atlantic coast of West Africa, is one of the poorest countries in the world², where medicine remains the least publicly funded area. Thus, in 2019, the country's GDP contribution to the health and social work sectors did not exceed 3.2%³. Prevention of vertical transmission of HIV, a key factor in improving maternal and child health, has been significantly reduced, and the average number of visits to antenatal care clinics has decreased [14, 15]. At the same time, the prevalence of HBV in the country is extremely high: unlike HIV, testing for viral hepatitis markers is rarely performed, even during antenatal check-ups of pregnant women, so most patients are not diagnosed with the disease. Since there is no screening for viral hepatitis, there is no prevention of vertical transmission of HBV. The incidence of HBV DNA is 22.36% among conventionally healthy individuals [16], 30.4% among blood donors [17], and 26.5 % among pregnant women in some regions of the country [18, 19]. It was previously shown that almost all HBsAg-positive women who gave birth naturally transmitted the virus to the child [20].

Despite the implementation of HBV vaccination in the country in 2006, the vaccination coverage currently does not exceed 47% of the population, which is due to the lack of a well-established infrastructure for storage and transport of vaccines that require compliance with the cold chain, as well as to the socio-cultural

¹ WHO. Hepatitis B: Fact sheet. 2023. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

² Countrymeters. Guinea Population. URL: <http://countrymeters.info/en/guinea> (дата обращения: 09.03.2023).

³ INS GUINÉE. Annuaire Statistique; 2019. URL: https://www.stat-guinee.org/images/Documents/Publications/INS/annuelles/annuaire/ANNUAIRE_STATISTIQUE_AGRICOLE_2019_INS_FINALISE.pdf (дата обращения: 20.12.2022).

peculiarities of the population, distrust of local residents in medical personnel [21].

There are relatively few data on the molecular genetic features of the virus circulating in the Republic of Guinea, and the characterization of the preCore/Core region is very limited in the literature [22].

The objective of this study was to analyze the variability of preCore/Core region of HBV strains circulating among pregnant women in the Republic of Guinea.

Materials and methods

Blood plasma samples obtained from 480 HBV-infected pregnant women living in the Republic of Guinea were used in this study [19]. Laboratory studies were conducted at the Russian-Guinean Scientific Research Centre for Epidemiology and Prevention of Infectious Diseases, located at the Institute of Applied Biology of Guinea in the prefecture of Kindia. The consent of the Ethical Committee of Guinea was obtained for this stage of work (protocol No. 129/CNERS/16 of 31.08.2015). All subjects gave written informed consent to participate in the experiment.

HBV DNA in blood plasma was determined by real-time PCR with hybridization-fluorescence detection using a method developed at the St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, which allows detection of HBV DNA at low viral load. The sensitivity of the method is 10 IU/ml when extracted from 100 µl of plasma [23]. Nucleotide sequences of complete HBV genomes were obtained using nested PCR based on overlapping primer pairs followed by Sanger sequencing [22]. The obtained HBV sequences were analyzed to identify mutations in the studied region of the HBV genome relative to the consensus sequence of the Mart-B47 virus (HE974377.1, genotype D) [23] to ensure uniformity in the designation of substitution positions and to identify substitutions characteristic of some genotypes but poorly (or not at all) represented in others. Furthermore, all sequences of genotypes A, D and E were analyzed relative to the reference sequences of the corresponding genotypes (GenBank international database numbers AY128092.1, NC_003977.2 and AB032431.1, respectively). The online database tool Geno2Pheno HBV⁴, as well as Hepatitis B Virus Phylogenetic Typing Tool⁵ were used, where AY128092.1, NC_003977.2 and AB032431.1 were also selected as reference strains from the proposed strains.

Statistical data processing was performed using the programs MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.), Statistica 8.0 (StatSoft Inc.). The Clopper-Pearson exact interval was used to assess statistical error. The results are presented with 95% confidence interval (95% CI). To assess the reliability of differences be-

tween data obtained in pairwise comparisons, the Fisher's exact test or the χ^2 test with Yates correction was used, depending on the characteristics of the samples. A probability value of $p < 0.05$ was determined as the threshold for the reliability of differences.

Results

The age of the subjects ranged from 13 to 55 years and averaged 25.8 years. The number of HBsAg-negative cases was 188 (39.17%; 95% CI 34.77-43.69%). HBV genotypes determined on the basis of phylogenetic analysis are presented in **Table 1** [19].

The nucleotide sequences of the viral genome of each sample were analyzed to study the preCore/Core region variability of HBV in the study group. The amino acid variability of the preCore region was determined in 211 individuals (43.96%; 95% CI 39.46-48.53%) and that of the Core-region in 473 individuals (98.54%; 95% CI 97.02-99.41%). Analysis of the preCore region revealed 12 polymorphic sites in which amino acid substitutions occurred, including 8 positions identified for genotype E, 5 for genotype D, and 2 for genotype A. The occurrence of amino acid substitutions in the pre-Core region is shown in **Fig. 1**.

During the comparative analysis, the distribution of mutations among HBV genotypes E, A and D was found to be significantly different ($p < 0.0001$). For genotype E, *H5D*, *L8Q*, and *C12R* substitutions, among others, were identified, which are not represented among isolates of genotypes A and D. In turn, the *V17L/I* mutation was shown only for HBV genotype A, and substitutions *A19T*, *S20F*, *L27V* were detected only in HBV genotype D. When analyzing the distribution of amino acid substitutions present in at least 2 genotypic groups, significant differences were also identified with a predominance of mutations among HBV genotype E: $\chi^2 = 16.206$; $df = 8$; $p = 0.0395$.

In the Core region, 67 positions of amino acid substitutions were identified, including 46 for genotype E, 23 for genotype A, and 26 for genotype D. The most common amino acid substitutions occurrence in the Core region is presented in **Fig. 2**.

The distribution of Core region mutations among HBV genotypes E, A and D is also significantly different ($p < 0.0001$). For genotype E, substitutions *S21H*,

Table 1. Hepatitis B virus genotypes circulating among pregnant women in the survey group

Genotype	Quantity	Share, %	95% CI
A1	8	1,67	0,72–3,26
A3	7	1,46	0,59–2,98
D1	3	0,63	0,13–1,82
D2	5	1,04	0,34–2,41
D3	11	2,29	1,15–4,06
E	446	92,9	90,24–95,05

⁴ URL: <https://hbv.geno2pheno.org/>

⁵ URL: <https://www.genomedetective.com/app/typingtool/hbv/>

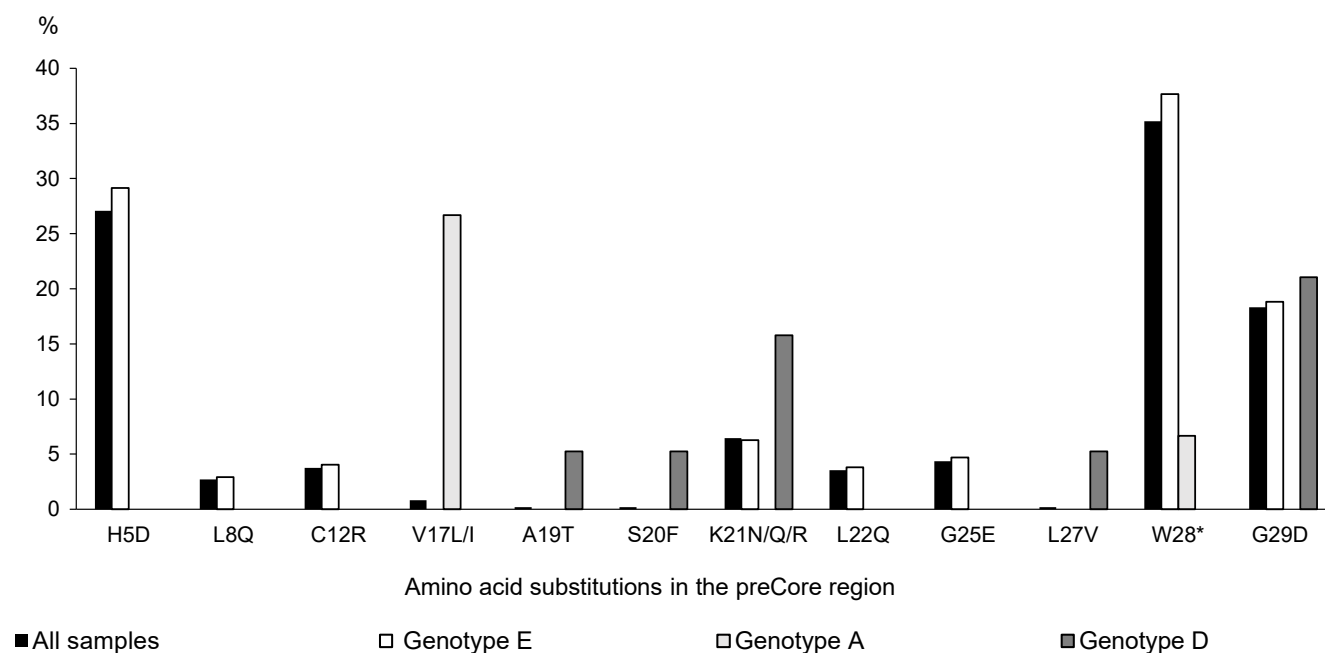


Fig. 1. Frequency of amino acid substitutions occurrence in the preCore region of the hepatitis B virus genome in the examined group and according to genotypes.

* — stop codon. Amino acid substitutions are presented relative to the consensus sequence of the Mart-B47 virus (HE974377.1, genotype D) with additional analysis relative to genotype-specific reference sequences AY128092.1 (genotype A), NC_003977.2 (genotype D) and AB032431.1 (genotype E).

V27I, R28K, Y38F, R39G, E46D, P79Q, M93V/I, G94A, F103L, I105T, T114P/V, F122C, W125T, R133T, S141P, L143T, T146N, V149I, R152G, R166P, R181P, Q184R/K/H, were identified, though not represented among HBV genotype A and D samples. Only mutations *A11S, A34S, G63V, E77D/Q, L95I, T142I/S, D153G, R159G, S183P* were detected among HBV genotype A, and mutations *I3L, D4Y, F9I, V13G, L15F, S17L, L19F, D29G, Q57R, L162N, S178T* were found among HBV genotype D samples. Evaluation of the distribution of polymorphic variants identified in at least 2 genotypic groups demonstrated significant ($p < 0.0001$) differences with higher frequency of occurrence and diversity of substitutions among HBV genotype E. Comparative inter-genotype analysis of the most common Core region amino acid substitutions occurrence in the examined group also showed differences ($p < 0.0001$).

The *A1762T/G1764A* double mutation was detected in the BCP of 74 HBV genotype E samples, accounting for 15.42% (95% CI 12.3–18.96%) of the total group and 16.59% (95% CI 13.26–20.38%) of patients with HBV genotype E. Information about the most frequent clinically significant BCP and preCore/Core region mutations in the group is presented in **Table 2**.

Discussion

The C gene and the Pre-C region of 555 nt and 87 nt, respectively, encode two proteins: HBcAg of 185 amino acids and HBeAg of 150 amino acids, which are the product of alternative translation initiation from

two AUG codons and post-translational modification. From the inner AUG codon, the structural polypeptide of the viral capsid Core protein of 21 kDa in size is synthesized. A 24 kDa preCore protein is encoded from the upstream AUG codon. The Core protein plays a key role in the HBV life cycle, and changes in its sequence can serve as potential markers of disease progression [12]. HBcAg serves as a key target for the host immune response, especially attack by CD4 and CD8 cytotoxic T-lymphocytes, whereby nonsynonymous mutations that alter immune epitopes can lead to the formation of escape variants from the immune response, resulting in HBV persistence. Moreover, as substitutions in Core region can lead to simultaneous substitutions in HBeAg, a key immunity regulation protein of the virus, they can have a significant impact on the natural course of chronic HBV [28]. BCP also plays a crucial role in viral replication, contributing to the formation of preCore and pregenomic RNA [29], which means that mutations in this region may also contribute to disease development. Mutations in different regions of the viral genome leading to such changes may be a consequence of both natural evolution of the virus and external influence, since both endogenous and exogenous selective effects lead to modification of the pathogen genome structure due to its high variability, especially during the long-term course of the disease [24].

In the study group, 15 people had HBV genotype A, including 8 cases of genotype A1, which is endemic to Africa and has a long evolutionary history on the

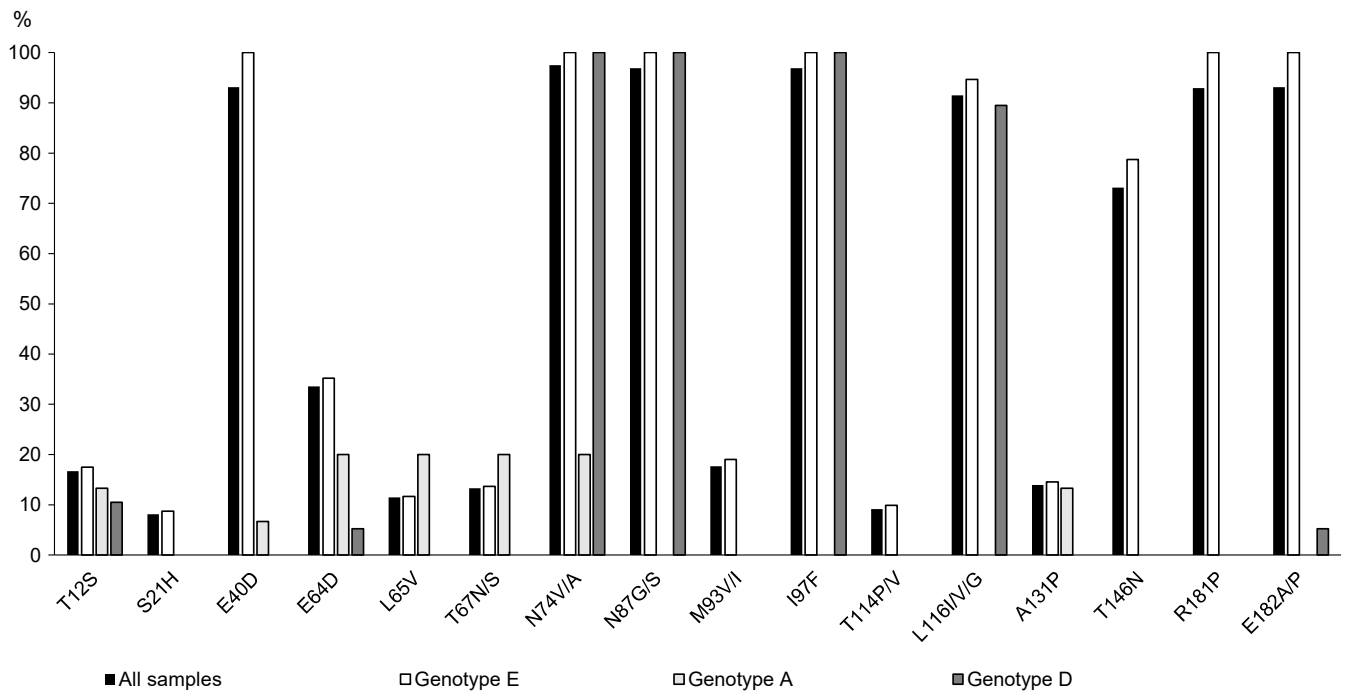


Fig. 2. Frequency of the most common amino acid substitutions occurrence in the Core region of the hepatitis B virus genome in the examined group and according to genotypes.

Amino acid substitutions are presented relative to the consensus sequence of the Mart-B47 virus (HE974377.1, genotype D) with additional analysis relative to genotype-specific reference sequences — AY128092.1 (genotype A), NC_003977.2 (genotype D) and AB032431.1 (genotype E).

continent. It has been previously shown that Africans infected with subgenotype A1 have a 4.5-fold higher risk of developing liver cancer than those infected with other genotypes, with cancer developing at an earlier age [30].

The majority of the cohort studied in the present study consisted of patients with HBV genotype E. This genotype is one of the most common variants in sub-Saharan Africa, including the Republic of Guinea and its neighboring countries. Despite its widespread occurrence, this variant of the virus has a relatively low genome variability compared to others, which may indicate its shorter evolutionary history [31]. At the same time, some researchers have raised concerns about the efficacy of HBV vaccine in genotype E, as breakthrough infections have often been observed in this genotype. Presumably, this may be due to the double mutation *A1762T/G1764A* in BCP, associated not only with the progression of liver disease, but also with a reduced level of secreted HBeAg, eluding the immune response [32]. Thus, the high incidence of HCC known for HBV genotype E may be related to both the prevalence of genome alterations leading to disease progression and the previously mentioned late detection of infection, with one factor complementing the other [31]. A high occurrence of the *A1762T/G1764A* double mutation (15.42%) was shown in our study group. Furthermore, a significant number of mutations in the preCore/Core region of HBV were detected, including a high frequen-

cy of the preCore *G1896A* mutation (35.21%), leading to the appearance of a stop codon (W28*), premature termination of the HBeAg precursor, responsible for more than 90% of cases of defective HBeAg secretion and, consequently, cancellation of antigen expression, which is characteristic of patients infected with HBV genotype E [33]. Note that a similarly high prevalence of the *G1896A* mutation (47.11%) was previously shown in residents of the Republic of Guinea with HBV genotype E [22]. The preCore region amino acid substitution H5D of HBV genotype E in HBsAg-negative genotype E identified in the present study is associated with severe liver disease. This mutation may also partially explain the high prevalence of HCC in Africa. Two more mutations, *K21N/Q/R* and *G29D* in the preCore region, significant for the development of HCC and associated with severe disease in HBsAg-negative individuals, were identified among isolates of genotypes E and D [26]. A significant number of mutations in the Core region at positions 113–143, known to affect antigenicity and particle stability and resulting in immune eluding mutants leading to chronic persistence of the virus, were found in the examined group.

For most of the amino acid substitutions identified in the Core-region, there is no reliable information on their clinical significance; however, HBeAg immune recognition sites are known, including target epitopes for human CD4⁺ T cells (amino acid positions 1–20, 50–69, 81–105, 117–131, 141–165), cytotoxic T lym-

Table 2. The most prevalent clinically significant mutations identified in the BCP and preCore/Core region in examined group

HBV genome region	Mutation	Frequency of occurrence in the group (n = 480)			Genotype	Clinical significance of the mutation
		n	%	95% CI		
BCP	A1762T/G1764A	74	15,42	12,30–18,96	E	Disease progression, liver cirrhosis and HCC [24, 25]
PreCore	H5D	130	27,08	23,16–31,30	E	Associated with severe liver disease in HBsAg-negative HBV genotype E. This mutation could partially explain the high prevalence of HCC in Africa [26]
PreCore	K21N/Q/R	31	6,46	4,43–9,04	E, D	Presumably associated with disease progression, especially in HBsAg-negative patients [26]
PreCore	W28* (G1896A)	169	35,21	30,93–39,67	E, A	Disease progression, liver cirrhosis and HCC [24, 25]
PreCore	G29D (G1899A)	88	18,33	14,97–22,09	E, D	
Core	E64D	161	33,54	29,33–37,96	E, A, D	Disease progression, liver cirrhosis and HCC, immune escape [24, 25]
Core	E113Q	19	3,96	2,40–6,11	E, A	Immune escape, selection of specific antibodies, chronic persistence of the virus, disease progression, liver cirrhosis and HCC [24, 25]
Core	T114P/V	44	9,17	6,74–12,11	E	
Core	L116I/V/G	439	91,46	88,59–93,8	E, D	
Core	F122C	11	2,29	1,15–4,06	E	
Core	W125T	13	2,71	1,45–4,59	E	
Core	P130T	29	6,04	4,08–8,56	E, D	
Core	A131P	67	13,96	10,98–17,38	E, A	
Core	R133T	11	2,29	1,15–4,06	E	
Core	S141P	12	2,5	1,30–4,33	E	
Core	L143T	14	2,92	1,60–4,85	E	
Core	T146N	351	73,13	68,92–77,04	E	Enhance the formation of HBV cccDNA during intracellular amplification, but impair cccDNA formation during infection [27]. Immune escape, selection of specific antibodies, chronic persistence of the virus, disease progression, liver cirrhosis and HCC [24, 25]

phocytes/CD8⁺ T cells (amino acid positions 18–27, 88–96, 130–140, 141–151), and B-cell epitopes (amino acid positions 74–89, 107–118, 127–138). Mutations in such immunogenic regions of HBcAg are vital for virus persistence, host immune response, and disease progression [25]. Thus, among the detected amino acid substitutions, a number of mutations are of potential clinical significance, contributing to the development of chronic HBV, for example, localized at T cell epitope sites (*T12S*, *E64D*, *L65V*, *M66I*, *T67N/S*, *A69S*, *N87G/S*, *T91N/S*, *M93V/I*, *G94A*, *I97F*, *F103L*, *I105T*, *F122C*, *W125T*, *P130T*, *A131P*, *S141P*, *L143T*, *T146N*, *V149I*, *R151Q*, *R152G*, *S157T*) and B cells (*N74V/A*, *P79Q*, *A80T*, *N87G/S*, *L108I*, *E113Q*, *T114P/V*, *L116I/V/G*, *P130T*, *A131P*, *R133T*). Amino acid substitutions in key immune epitopes have the potential to evade the immune response, which in turn may be one of the causes of HBsAg-negative HBV, lead to persistent infection and high variability in all regions of the viral genome [34]. It should be noted that among the listed mutations there are those that are significantly associated with the development of liver cirrhosis and HCC, including those located in B-cell epitopes *E77D/Q*, *A80T*

and *L116I/V/G*, as well as in T-cell epitopes *E64D* and *T91N/S*. Given the high occurrence of such substitutions, their significant role in the increased prevalence of severe liver diseases in African countries, especially in cases of HBV genotype E, cannot be excluded. The amino acid substitutions of particular interest are those detected in absolutely every genotype E individual examined — *E40D*, *N74V/A*, *N87G/S*, *I97F*, *R181P*, *E182A/P*, which, given their 100% representation, may be characteristic of genotype E in general or associated with the peculiarities of this genetic variant of the virus in the Republic of Guinea, but, on the other hand, are associated with the progression of liver disease.

The study showed greater variability in the pre-Core/Core region of genotype E compared to A and D, while it is known that HBV genotype E in general is characterized by relative heterogeneity compared to other genotypes. It is apparent that the results of this study contradicting this fact are related to the fact that isolates of genotype E prevailed in the group, while genotypes A and D are represented by single cases.

The occurrence of mutations among HBV genotype E isolates has increased significantly over the past

15 years. In 2009, P. Garmiri et al. demonstrated that in the Republic of Guinea, 26.0% of HBV genotype E cases had 1 or more mutations at positions 1762, 1764 and/or 1896, a premature stop codon associated with the *G1896A* mutation was observed in 20.8% of sequences, and 5.2% had a triple mutation [35]. In this current study, *G1896A* presented 1.5 times more frequently (35.21%), and triple mutation was shown in 47 individuals – 9.79% (95% CI 7.28–12.81%) of the total group and 10.54% (95% CI 7.85–13.77%) of those with genotype E. These mutations most likely represent a consequence of natural polymorphism of the virus. However, mutations in positions 1762, 1764, 1896 are among the most common. In Pakistan, *A1762T/G1764A* was observed in 30% of cases, *G1896A* — in 38% of cases [36]. In Ethiopia, the occurrence of *A1762T/G1764A* was 25.9% of cases and *G1896A* was 25.2% of cases [37]. In Brazil, the occurrence of *A1762T/G1764A* was 59.3% of cases and *G1896A* was 84.1% of cases [38]. Furthermore, the occurrence of these mutations is often associated with the virus genotype. For example, the occurrence of *A1762T/G1764A* in Vietnam was 93.3% for genotype C and 50% for genotype B, and *G1896A* was 74.2% for genotype B and 2.2% for genotype C [39]. The analysis of 6479 HBV sequences of different genotypes from the international database allowed us to determine the overall frequency of *A1762T/G1764A* — 28.9%, the representation of this double mutation in relation to genotypes was as follows: A — 26.9%; B — 15.5%; C — 46.1%; D — 21.5%; E — 11%; F — 22.5%; G — 97.5%; H — 3.8%, but it should be noted that the sample volume of genotypes E-H was significantly smaller than the other genotypes [40]. This seems to be the reason for the relatively low occurrence of *A1762T/G1764A* in genotype E, whereas, for example, in Nigeria, where the study population was predominantly genotype E, *A1762T/G1764A* was detected in 43% of cases and *G1896A* in 57% of cases [41].

It should be noted that in our cohort HBsAg-negative and low viral load samples showed more variability throughout the preCore/Core region, which may be

related to the inhibition of HBV replication due to mutations in preCore/Core region. Numerous studies have described an association between the frequency of mutations in the preCore/Core region and the progression of liver disease in HBV-infected patients, but the association between amino acid substitutions and clinical severity of disease varies considerably both between different populations and between studies conducted in the same populations. This apparent discrepancy can be explained by various factors, including virus genotype, patient ethnicity, host immune competence, and coinfection with other viruses. Nevertheless, a number of mutations that have been shown to be significantly associated with liver cirrhosis and HCC, as well as affecting HBeAg serological status, may serve as diagnostic and prognostic markers for early detection of liver disease progression in HBV-infected individuals.

Conclusion


The prevalence of clinically significant amino acid substitutions in HBV preCore/Core region in treatment-naïve pregnant women in the Republic of Guinea reflects their occurrence in the population and indirectly explains the reasons for the extremely high incidence of HCC in African countries. A number of such amino acid substitutions, associated with disease progression as shown for genotypes A and D, are characteristic of genotype E. Identification of genotypes and mutations in the virus genome can be used to predict disease progression. The identified variability indicates the need to study the peculiarities of the pathogen and host immune response, including in HBsAg-negative HBV infections. The results of this study demonstrate the necessity to raise awareness of the growing epidemic crisis of HBV in sub-Saharan Africa. This region is at the bottom of the list in terms of access to a range of health care services, including screening, diagnosis and treatment of people infected with the virus. The results of the study can serve as baseline data for estimating national HBV incidence and planning mass HBV immunization in the Republic of Guinea.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015;386(10003):1546–55. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
- Kean E., Funk A.I., Shimakawa Y. Systematic review with meta-analysis: the risk of mother to child transmission of HBV infection in Sub-Saharan Africa. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016;44(10):1005–17. DOI: <https://doi.org/10.1111/apt.13795>
- Yao N., Fu S., Wu Y., et al. Incidence of mother-to-child transmission of hepatitis B in relation to maternal peripartum antiviral prophylaxis: A systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2022;101(11):1197–206. DOI: <https://doi.org/10.1111/aogs.14448>
- Shimakawa Y., Lemoine M., Njai H.F., et al. Natural history of chronic HBV infection in West Africa: a longitudinal population-based study from The Gambia. *Gut*. 2016;65(12):2007–16. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309892>
- Wang C.C., Cheng P.N., Kao J.H. Systematic review: chronic viral hepatitis and metabolic derangement. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2020;51(2):216–30. DOI: <https://doi.org/10.1111/apt.15575>
- Kew M.C., Welschinger R., Viana R. Occult hepatitis B virus infection in Southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008;23(9):1426–30. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05481.x>
- Ladep N.G., Lesi O.A., Mark P., et al. Problem of hepatocellular carcinoma in West Africa. *World J. Hepatol.* 2014;6(11):783–92. DOI: <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i11.783>
- Mulrooney-Cousins P.M., Michalak T.I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 2007;13(43):5682–6. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i43.5682>
- Lin Y.Y., Liu C., Chien W.H., et al. New insights into the evolutionary rate of hepatitis B virus at different biological scales. *J. Virol.* 2015;89(7):3512–22. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03131-14>
- Lin C.L., Kao J.H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015;5(5):a021436. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>
- Cao G.W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J. Gastroenterol.* 2009;5(46):5761–9. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5761>
- Yll M., Cortese M.F., Guerrero-Murillo M., et al. Conservation and variability of hepatitis B core at different chronic hepatitis stages. *World J. Gastroenterol.* 2020;26(20):2584–98. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i20.2584>
- Mixon-Hayden T., Lee D., Ganova-Raeva L., et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infections in United States-bound refugees from Asia and Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014;90(6):1014–20. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0068>
- Camara B.S., Delamou A., Diro E., et al. Effect of the 2014/2015 Ebola outbreak on reproductive health services in a rural district of Guinea: an ecological study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2017;111(1):22–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/trstmh/trx009>
- Leno N.N., Delamou A., Koita Y., et al. Ebola virus disease outbreak in Guinea: what effects on prevention of mother-to-child transmission of HIV services? *Reprod. Health.* 2018;15(1):60. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12978-018-0502-y>
- Бумбали С., Серикова Е.Н., Семенов А.В. и др. Значимость лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов в Гвинейской Республике. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021;98(4):440–9. Bumbali S., Serikova E.N., Semenov A.V., et al. Significance of parenteral viral hepatitis laboratory diagnostics in the Republic of Guinea. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2021;98(4):440–9. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-116> EDN: <https://elibrary.ru/wdbxjj>
- Бумбали С., Балде Т.Л., Семенов А.В. и др. Распространенность маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике. *Вопросы вирусологии.* 2022;67(1):59–68. Bumbali S., Balde T.L., Semenov A.V., et al. Prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the Republic of Guinea. *Problems of Virology.* DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92> EDN: <https://elibrary.ru/zybhjz>
- Балде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н. и др. Сравнительный анализ вертикального риска передачи некоторых гемоконтактных инфекций в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021;(1):87–94. Balde T.A.L., Bumbali S., Serikova E.N., et al. Comparative analysis of the vertical risk of transmission of some blood-borne infections in the republic of Guinea. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-87-94> EDN: <https://elibrary.ru/upnyfx>
- Балде Т.А.Л., Останкова Ю.В., Бумбали С. и др. Частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости и ускользания от иммунного ответа в геноме вируса гепатита В, выявленного у беременных в Гвинейской Республике. *Вопросы вирусологии.* 2023;68(3):228–41. Balde T.A.L., Ostantkova Yu.V., Bumbali S., et al. Frequency of drug resistance and immune escape mutations in the hepatitis B virus genome detected in pregnant women in the Republic of Guinea. *Problems of Virology.* DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-175> EDN: <https://elibrary.ru/scvbmj>
- Kaba D., Bangoura M.A., Sylla M.M., et al. Prevalence and factors associated with hepatitis B in a cohort of HIV-infected children in the Pediatric Department at Donka National Hospital, Guinea. *Pan. Afr. Med. J.* 2019;34:182. DOI: <https://doi.org/10.11604/pamj.2019.34.182.16275>
- Попова А.Ю., Кутырев В.В., Тоголян А.А., ред. *Генатум В в странах Западной Африки: эпидемиология, диагностика, профилактика.* СПб.; 2021. Попов А.Ю., Kutyrev V.V., Totolyan A.A., ed. *Hepatitis B in West African Countries: Epidemiology, Diagnosis, Prevention.* St. Petersburg; 2021. EDN: <https://elibrary.ru/lpjvsd>
- Бумбали С., Серикова Е.Н., Балде Т.Л. и др. Аминокислотные замены в регионах CORE и HBsAg вируса гепатита В при моноинфекции и ВГВ/ВИЧ-коинфекции в Гвинейской республике. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.* 2021;13(3):96–107. Boumbaly S., Serikova E.N., Balde T.A.L., et al. Amino acid substitutions in core and HBsAg regions of hepatitis B virus in patients with monoinfection and HBV/HIV-coinfection in the Republic of Guinea. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders.* 2021;13(3):96–107. DOI: <http://doi.org/10.22328/2077-9828-2021-13-3-122-133> EDN: <https://elibrary.ru/vnjjas>
- Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Тоголян А.А. Метод выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2022;67(9):530–7. Ostantkova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Totolyan A.A. Method for hepatitis b virus DNA detecting in biological material at low viral load based on nested PCR with detection on three viral targets in real-time mode. *Clinical Molecular Studies.* 2022;67(9):530–7. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537>
- Brichler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate

- on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013;94 (Pt. 10):2318–29.
DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.055459-0>
25. Kumar R. Review on hepatitis B virus precore/core promoter mutations and their correlation with genotypes and liver disease severity. *World J. Hepatol.* 2022;14(4):708–18.
DOI: <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i4.708>
 26. Al-Qahtani A.A., Al-Anazi M.R., Nazir N., et al. The correlation between hepatitis B virus precore/core mutations and the progression of severe liver disease. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018;8:355. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00355>
 27. Mendenhall M.A., Hong X., Hu J. Hepatitis B virus capsid: the core in productive entry and covalently closed circular DNA formation. *Viruses.* 2023;15(3):642.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v15030642>
 28. Kim H., Lee S.A., Do S.Y., Kim B.J. Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J. Gastroenterol.* 2016;22(17):4287–96.
DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i17.4287>
 29. Quarleri J. Core promoter: a critical region where the hepatitis B virus makes decisions. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:425–35. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i2.425>
 30. Kew M.C., Kramvis A., Yu M.C., et al. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-Saharan Africans. *J. Med. Virol.* 2005;75(4):513–21. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.20311>
 31. Ingasia L.A.O., Kostaki E.G., Paraskevis D., Kramvis A. Global and regional dispersal patterns of hepatitis B virus genotype E from and in Africa: A full-genome molecular analysis. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240375.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240375>
 32. Malagnino V., Salpini R., Maffongelli G., et al. High rates of chronic HBV genotype E infection in a group of migrants in Italy from West Africa: Virological characteristics associated with poor immune clearance. *PLoS One.* 2018;13(3):e0195045.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195045>
 33. Bannister E.G., Yuen L., Littlejohn M., et al. Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) in African children living in Australia identifies genotypes and variants associated with poor clinical outcome. *J. Gen. Virol.* 2018;99(8):1103–14.
DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001086>
 34. Sanaei N., Hashemi S.M.A., Dehno S.Z.S., et al. Precore/core mutations of hepatitis B virus genotype D arising in different states of infection. *Clin. Exp. Hepatol.* 2022;8(1):21–8.
DOI: <https://doi.org/10.5114/ceh.2022.114253>
 35. Garmiri P., Loua A., Haba N., et al. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *J. Gen. Virol.* 2009;90(10):2442–51.
DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.012013-0>
 36. Ahmad I., Ahmad K. Molecular characterization of hepatitis B virus basal core promoter and precore region of isolates from chronic hepatitis B patients. *J. Pak. Med. Assoc.* 2021;71(6):1575–82. DOI: <https://doi.org/10.47391/JPMA.1254>
 37. Belyhun Y., Liebert U.G., Maier M. Analysis of HBV basal core promoter/precore gene variability in patients with HBV drug resistance and HIV co-infection in Northwest Ethiopia. *PLoS One.* 2018;13(2):e0191970.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191970>
 38. Chachá S.G.F., Gomes-Gouvêa M.S., Malta F.M., et al. Basal core promoter and precore mutations among hepatitis B virus circulating in Brazil and its association with severe forms of hepatic diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2017;112(9):626–31. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760160540>
 39. Ho P.T., Balzanelli M.G., Distratis P., et al. Characteristics of hepatitis B virus genotype and sub-genotype in hepatocellular cancer patients in Vietnam. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(10):2393. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102393>
 40. Araujo N.M., Teles S.A., Spitz N. Comprehensive analysis of clinically significant hepatitis B virus mutations in relation to genotype, subgenotype and geographic region. *Front. Microbiol.* 2020;11:616023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616023>
 41. Grant J., Agbaji O., Kramvis A., et al. Hepatitis B virus sequencing and liver fibrosis evaluation in HIV/HBV co-infected Nigerians. *Trop. Med. Int. Health.* 2017;22(6):744–54.
DOI: <https://doi.org/10.1111/tmi.12873>

Information about the authors

Yulia V. Ostankova  — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of immunology and virology of HIV infection, senior researcher, Laboratory of molecular immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, shenna1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Thierno A.L. Balde — researcher, Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-3808-64380>

Sanaba Boumbaly — Cand. Sci. (Biol.), Chief, Graduate school, Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea; Director, Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée, Nzerekare, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Elena N. Serikova — junior researcher, Laboratory of immunology and virology of HIV infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Elena B. Zueva — Cand. Sci. (Biol.), biologist, Department for diagnosing HIV infection and AIDS-related diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Diana E. Reingardt (Valutite) — doctor of clinical laboratory diagnostics, Department for diagnosing HIV infection and AIDS-related diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Alexandr N. Schemelelev — junior researcher, Laboratory of immunology and virology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Vladimir S. Davydenko — junior researcher, Laboratory of immunology and virology of HIV infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0078-9681>

Ekaterina V. Anufrieva — junior researcher, Laboratory of immunology and virology of HIV infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0002-1882-529X>


Elena V. Esaulenko — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of viral hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3669-1993>

Areg A. Totolian — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Author contribution: *Ostankova Yu.V.* — concept and design of the study, analysis of nucleotide sequences (phylogenetic, mutational), statistical processing, writing the text; *Balde T.A.L.*, *Bumbali S.* — collection of clinical material; *Serikova E.N.*, *Zueva E.B.*, *Reinhardt D.E.*, *Shchemelelev A.N.*, *Davydenko V.S.*, *Anufrieva E.V.* — processing of clinical material, performing the laboratory stage of research (NA extraction, PCR, sequencing); *Esaulenko E.V.* — general research management; *Totolian A.A.* — general research management, 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 23.12.2023;
accepted for publication 20.02.2024;
published 28.02.2024

Информация об авторах

Останкова Юлия Владимировна  — к.б.н., зав. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, с.н.с. лаб. молекулярной иммунологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, shenna1@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Бальде Тьерно Амаду Лабэ — сотрудник НИИ прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинея, Республика, <https://orcid.org/0000-0002-3808-64380>

Бумбали Санаба — к.б.н., зав. аспирантурой НИИ прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинея, Республика, директор Международного центра исследований тропических инфекций в Гвинеи, Нзерекаре, Гвинея, Республика, <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Серикова Елена Николаевна — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Зуева Елена Борисовна — к.б.н., биолог отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Рейнгардт (Валутите) Диана Эдуардовна — врач клинической лабораторной диагностики отделения ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Щемелев Александр Николаевич — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Давыденко Владимир Сергеевич — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0078-9681>

Ануфриева Екатерина Владимировна — м.н.с. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0002-1882-529X>

Эсауленко Елена Владимировна — д.м.н., профессор, зав. лаб. вирусных гепатитов Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3669-1993>

Тотolian Арег Артемович — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <http://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Вклад авторов: *Останкова Ю.В.* — концепция и дизайн исследования, анализ нуклеотидных последовательностей (филогенетический, мутационный), статистическая обработка данных, написание текста; *Бальде Т.А.Л.*, *Бумбали С.* — сбор клинического материала; *Серикова Е.Н.*, *Зуева Е.Б.*, *Рейнгардт Д.Э.*, *Щемелев А.Н.*, *Давыденко В.С.*, *Ануфриева Е.В.* — обработка клинического материала, выполнение лабораторного этапа исследований (экстракция НК, ПЦР, секвенирование); *Эсауленко Е.В.* — общее руководство исследованием; *Тотolian Арег А.* — общее руководство исследованием, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 23.12.2023;
принята к публикации 20.02.2024;
опубликована 28.02.2024

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-493>

An integrative approach to assessing the pathogenic potential of *Escherichia coli* strains isolated from urine

Mariia A. Makarova^{1,2✉}, Zoya N. Matveeva¹, Lidiya A. Kaftyreva^{1,2}¹Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) are characterized by the ability to survive and reproduce in the urinary tract due to the presence of specific virulence factors. In routine laboratory practice, the detection of diagnostically significant bacteriuria does not provide an idea of the level of infection of the urinary system (renal parenchyma, bladder), the pathogenic potential of the strain in the progression and chronicity of the infectious process, and the occurrence of life-threatening conditions (urosepsis, meningitis).

Objective. To characterize the population structure, genetic diversity and pathogenic potential of *E. coli* strains isolated from urine.

Materials and methods. 194 strains of *E. coli* isolated from urine were studied. Detection of 17 genes encoding the synthesis of: adhesins (*pap*, *fimH*, *sfa*, *focG*, *afa*), toxins (*hlyA*, *cvaC*, *cnf*, *cdtB*), capsular antigens (*kpsMTII*, *kpsMTIII*, *kpsMT K1*), siderophores (*fyuA*, *iutA*), invasins (*ibeA*), genetic markers of the pathogenicity island (PAI) of UPEC CFT073, the gene (*traT*) encoding serum resistance capacity and phylogenetic groups were performed by PCR (CXT-1000, BioRad, USA) with published primers (Synthol, Sibenzyme, Evrogen, Russia). To assess the statistical significance of differences, Fisher's exact test was used. Differences were considered significant at a confidence interval of 95% ($p < 0.05$).

Results. *E. coli* strains more often ($p < 0.05$) belonged to the phylogenetic group B2 (57.7%). Pathogenetically significant virulence determinants were identified in 97.9% of strains. Based on the combination of 17 genes, 134 individual virulence genotypes were identified. In 93.3% of strains, a genetic predisposition to the occurrence of recurrent urinary tract infections (UTIs) was revealed, in 6.9% there was a potential for the development of pyelonephritis and recurrent cystitis. Markers of life-threatening complications of UTI were identified in 12% of strains, of which 10.7% were the development of urosepsis and 1.3% were meningitis.

Conclusion. Detection of a complex of genes in *E. coli* strains isolated from urine confirms the etiological significance of the isolate and allows one to assess the pathogenic potential for the development of chronic and severe life-threatening complications.

Keywords: urinary tract infections, uropathogenic *E. coli*, UPEC, virulence, laboratory diagnostics

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. 27, July 2, 2020).

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

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

For citation: Makarova M.A., Matveeva Z.N., Kaftyreva L.A. An integrative approach to assessing the pathogenic potential of *Escherichia coli* strains isolated from urine. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):72–79.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-493>

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

Интегративный подход к оценке патогенного потенциала штаммов *Escherichia coli*, выделенных из мочи

Макарова М.А.^{1,2✉}, Матвеева З.Н.¹, Кафтырева Л.А.^{1,2}

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

²Северо-Западная медицинская академия имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Актуальность. Уропатогенные/Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) характеризуются способностью к выживанию и размножению в мочевом тракте за счёт наличия специфических факторов вирулентности. В рутинной практике выявление диагностически значимой бактериурии не даёт представления о локализации инфицирования мочевой системы (почечная паренхима, мочевой пузырь), патогенном потенциале выделенного штамма в прогрессировании и хронизации инфекционного процесса, возникновении жизнеугрожающих состояний (уросепсис, менингит).

Цель — охарактеризовать популяционную структуру, генетическое разнообразие и патогенный потенциал штаммов *E. coli*, выделенных из мочи.

Материалы и методы. Изучены 194 штамма *E. coli*, выделенные из мочи. Детекцию 17 генов, кодирующих синтез: адгезинов (*pap*, *fimH*, *sfa*, *focG*, *afa*), токсинов (*hlyA*, *cvaC*, *cnf*, *cdtB*), капсульных антигенов (*kpsMTII*, *kpsMTIII*, *kpsMT K1*), сидерофоров (*fyuA*, *iutA*), инвазинов (*ibeA*), генетических маркеров острова патогенности UPEC CFT073, гена *traT*, кодирующего фактор резистентности к бактерицидному действию сыворотки и принадлежность к филогенетическим группам, выполняли методом ПЦР. Для оценки статистической значимости различий применяли точный критерий Фишера. Достоверными считали различия при 95% доверительном интервале ($p < 0,05$).

Результаты. Штаммы *E. coli* чаще ($p < 0,05$) принадлежали к филогенетической группе B2 (57,7%). Патогенетически значимые детерминанты вирулентности выявлены у 97,9% штаммов. По сочетанию 17 генов установлены 134 индивидуальных генотипа вирулентности. У 93,3% штаммов выявлена генетическая предрасположенность к возникновению рецидивов инфекций мочевыводящих путей, у 6,9% — потенциал развития пиелонефрита и рецидивирующего цистита. Маркеры жизнеугрожающих осложнений инфекций мочевыводящих путей выявлены у 12% штаммов, из них 10,7% свидетельствовали о развитии уросепсиса, 1,3% — менингита.

Заключение. Детекция комплекса генов в штаммах *E. coli*, выделенных из мочи, подтверждает этиологическую значимость изолята и позволяет оценить патогенный потенциал развития хронических форм и тяжёлых жизнеугрожающих осложнений.

Ключевые слова: инфекции мочевыводящих путей, уропатогенные *Escherichia coli*, UPEC, вирулентность, лабораторная диагностика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 27 от 02.07.2020).

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

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

Для цитирования: Макарова М.А., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А. Интегративный подход к оценке патогенного потенциала штаммов *Escherichia coli*, выделенных из мочи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):72–79.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-493>

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

Introduction

The urinary tract is a common locus of bacterial infection, and *Escherichia coli* is the most frequent pathogen in this biotope. Urinary tract infections (UTIs) can present with a variety of clinical presentations ranging from asymptomatic bacteriuria, ascending infections (acute pyelonephritis) to severe urosepsis [1-3].

Uropathogenic *E. coli* (UPEC) are characterized by an increased adaptive ability to survive and multiply in the urinary tract due to the presence of specific lipopolysaccharides, capsules, outer membrane proteins, fimbriae, pili, secreted toxins, siderophores, as well as serum resistance. The uropathogenic potential of *E. coli* is consistently realized at different stages of the infection process: adhesion, colonization and persistence [4].

Specific adhesins are required for successful colonization of the urinary system tissues by *E. coli*. The major adhesion factors include pili or fimbriae. Type 1 pili (FimH), P, S, and F1C fimbriae are typical for UPEC. FimH adhesins, encoded by the *fimH* gene, play an important role in the initiation of UTI development and are considered the most common virulence factor of UPEC [5, 6]. Strains causing cystitis always express type 1 fimbriae; in the absence of other fimbriae, infection is limited to bladder lesions. The major UPEC-specific pili are the P-fimbriae encoded by the *pap* gene. They are absent in commensal and diarrheagenic *E. coli* and were named this way because they are more frequently found in strains associated with pyelonephritis [7]. Mannose-resistant S pili are categorized into Sfa-, F1C-pili (Foc) and S/F1C-related pili (Sfr). These adhesins have a high degree of homology but differ in receptor specificity; S-pili are expressed predominantly by sepsis- (SEPEC) and neonatal meningitis-causing *E. coli* (NMEC) strains, but may also occur in UPEC strains causing ascending UTIs. In addition to fimbrial adhesins, afimbrial adhesins encoded by the *afa* gene, which promote adhesion to urothelial cells, are widely distributed in UPEC. Strains synthesizing afimbrial adhesins have a high potential for the development of pyelonephritis and recurrent cystitis [8].

Toxins play an important role in UTIs because they promote bacterial dissemination in tissues, increase cytotoxicity, neutrophil resistance, as well as damage and disrupt host cell metabolism. The most studied toxin secreted by UPEC is α -hemolysin, *HlyA* (a product of the *hlyA* gene), which not only stimulates apoptosis of target cells, including neutrophils, T lymphocytes, and renal epitheliocytes, but also causes degradation of regulatory and structural components of the cytoskeleton, promoting bladder cell exfoliation and phagocyte destruction. CNF1 (cytotoxic necrotic factor 1) toxin encoded by the *cnf* gene inhibits polymorphonuclear phagocytosis, promotes the production of bioactive components, causing functional and structural damage as well as apoptosis of bladder epithelial cells

[6, 8]. A toxin with DNAase activity, CDT (cytotoxic toxin expansion factor), encoded by the *cdt* gene, leads to cell apoptosis; it is found in more than 90% of UPEC strains [9, 10].

Factors of UPEC persistence include capsules (synthesis of K-antigens), which protect the bacteria from phagocytosis and the bactericidal effect of the complement system [8].

The production of siderophores (iron-binding proteins), which determine the ability of bacterial cells to capture iron, is crucial for the survival of UPEC in the urethral tract. Synthesis of siderophores increases the virulence of UPEC. The main siderophores include aerobactin (*iutA*) and yersinebactin (*fyuA*) [11].

In the routine practice of bacteriologic examination, methods for typing *E. coli* causing UTIs are not used. The criterion for the diagnosis of UTI is the detection of microorganisms at a concentration of at least 10^3 CFU in 1 ml of urine. The detection of diagnostically significant bacteriuria does not give an idea of the localization of infection of the urinary system (renal parenchyma, bladder) [1]. Therefore, one of the most important tasks of the clinical microbiology laboratory is a meaningful analysis of the results obtained, as well as an assessment of the etiologic significance of the isolated microorganism [12]. The main difficulty in interpreting the results is represented by isolates from urine specimens, due to the possible contamination of *E. coli* by representatives of intestinal microflora. The microbiologist must not only determine whether the *E. coli* isolate is the true pathogen or a consequence of contamination of the sample at the pre-analytical stage, but also assess the pathogenic potential of a particular isolate in the development of chronic UTIs or severe life-threatening conditions such as sepsis or meningitis. Although research has been ongoing for many years, specific criteria for categorizing strains as UPEC have not been established.

As a result of the above, the aim of this work is to characterize the population structure, genetic diversity and pathogenic potential of *E. coli* strains isolated from urine.

Materials and methods

The objects of the study were 194 *E. coli* strains isolated from the urine of patients with uncomplicated UTIs. The subject of the study was biological properties of the strains reflecting pathogenicity (virulence genes associated with adhesion, invasion, toxin formation, persistence, etc.).

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. 27, July 2, 2020).

DNA isolation was performed using the InstaGeneTMMatrix kit (BioRad). PCR was performed in automatic amplification mode in the thermocycler

CXT-1000 (BioRad). We used a ready mix with Taq DNA polymerase, PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific). The primers were added between 0.5–1.5 µl with unchanged sample volume (20 µl), which was achieved by changing the volume of sterile distilled water accordingly. Previously studied primers (Syntol, Sibenzyme, Eurogen) were used [13–15]. The amplified DNA fragments were separated in 0.5×TBE buffer with ethidium bromide at 120 V for 60 min in a horizontal gel electrophoresis chamber (BioRad). GelDoc documentation system (BioRad) was used to visualize PCR results. DNA marker 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb (Sibenzyme) was used as molecular weight markers.

Strains were tested for the presence of 17 genes encoding the synthesis of virulence factors: Adhesins (*pap*, *fimH*, *sfa*, *focG* and *afa*), toxins (*hlyA*, *cvaC*, *cnf* and *cdtB*), capsule antigens (*kpsMTII*, *kpsMTIII*, *kpsMT K1*), siderophores (*fyuA* and *iutA*), invasins (*ibeA*), as well as for the presence of genetic markers of pathogenicity island (PAI) UPEC CFT073 and gene (*traT*) encoding a serum resistance.

Phylogenetic classification of *E. coli* strains was performed by multiplex phylotyping based on PCR using primers targeting three markers: *chuA*, *yjaA*, and TspE4.C2 [16].

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

Results

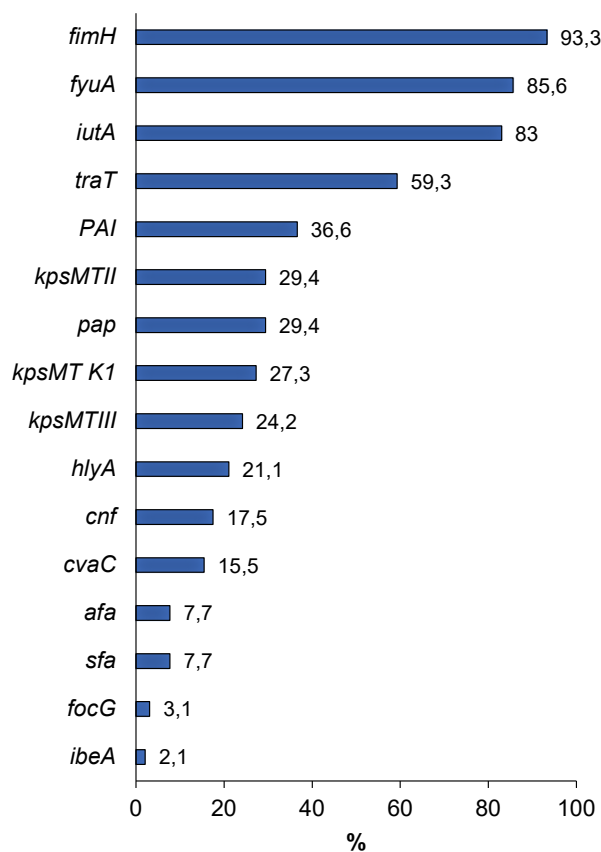
When analyzing the combination of *chuA*, *yjaA*, and TspE4.C2 genes, it was found, statistically, that *E. coli* strains were significantly more frequent ($p < 0.05$) in phylogenetic group B2 (57.7%) compared to strains of phylogenetic groups A (4.6%), B1 (7.2%), and D (30.4%); significantly less frequent ($p < 0.05$) in phylogenetic groups A and B1 compared to B2 and D.

The prevalence of genes encoding the synthesis of UPEC virulence factors ranged from 2.1% (*ibeA*) to 93.3% (*fimH*). The gene responsible for the production of cytolethal expanding toxin (*cdtB*), involved in the suppression of cell proliferation with subsequent cell death, was not identified in any of the strains. The frequency of occurrence of genetic determinants encoding UPEC virulence factors is shown in the figure below.

Analysis of the detection of genes associated with adhesion showed that almost all strains contained the *fimH* gene (93.3%) encoding mannose-sensitive type I fimbriae. The *pap* gene, responsible for the synthesis of pyelonephritis-associated pili, was found in almost every third strain (29.4%); the *afa* gene, encoding afimbrial adhesins, was found in 7.7% of the studied *E. coli* strains; *sfa* and *focG* determinants associated with fimbrial adhesins — in 7.7 and 3.1%; *hlyA* and

cnf genes encoding synthesis of toxins (α -hemolysin and cytotoxic factor) — in 21.1 and 17.5%; *cvaC* gene responsible for colicin V production — in 15.5%. The *ibeA* gene responsible for invasion of endothelial cells of the blood-brain barrier was found in 4 (2.1%) *E. coli* strains. The frequency of occurrence of genetic determinants encoding synthesis of siderophores: yersinebactin (*fyuA*) and aerobactin (*iutA*) was 85.6 and 83.0%. Genes encoding capsular antigen synthesis were detected in 61.9% of the strains studied. The *kpsMTII* and *kpsMTIII* genes encoding K1, K5, K12 and K3, K10, K54 antigen complexes were detected in 29.4 and 24.2% of the strains. Type-specific gene *kpsMT K1*, encoding antigen K1, identical in chemical structure and immunochemical characteristics to the K-antigen of *Neisseria meningitidis*, was detected in 27.3% of strains. The *traT* gene, a coding factor of bacterial cell resistance to the bactericidal effect of the blood serum, was detected in 59.3% of strains. PAI — UPEC CFT073 was detected in 36.6% of strains.

The genetic determinants of UPEC virulence in the studied strains were present both in combinations and in isolation. None of the tested virulence genes was detected in the genome of 4 (2.1%) strains. In 1 (0.5%; 95% CI 0.1–2.9%) strain 1 gene was detected. The remaining 99.5% of strains were characterized by the presence of gene combinations, of which 1.5% (95% CI 0.5–4.5%) — by the combination of 2 genetic determi-



Prevalence of genes encoding UPEC virulence factors.

nants, 10.3% (95% CI 6.8–15.4) — by 3. Strains containing combinations of 4 genes 16.0% (95% CI 11.5–21.8%), 5 genes 23.2% (95% CI 17.8–29.6%), and 6 genes 33.0% (95% CI 26.8–39.9%) were statistically significantly more frequent ($p < 0.05$). Seven virulence markers were detected in 9.8% (95% CI 6.4–14.8%) of strains, 8 in 3.1% (95% CI 1.4–6.6%), and 9 in 2.1% (95% CI 0.8–5.2%). The genome of 1 strain (0.5%; 95% CI 0.1–2.9%) presented an individual profile and was characterized by a combination of 10 genes.

The occurrence of genes and virulence factors encoded by them in *E. coli* of different phylogenetic groups are presented in the **Table**. The *fimH* gene was present in strains of all phylogenetic groups significantly more frequently ($p < 0.05$) compared to other genes associated with adhesion. The *pap* gene was found in *E. coli* strains of phylogenetic group B2 (36.6%), which was significantly more frequent ($p < 0.05$) compared to strains of groups A (11.1%), B1 (14.3%) and D (1.7%).

The *afa* gene encoding afimbrial antigen-binding adhesins was more frequently present in strains of phylogenetic group B1 (64.3%). The *sfa* gene encoding fimbrial adhesin synthesis was detected without significant differences in strains of phylogenetic groups B1 (4.8%) and B2 (11.8%). The *focG* gene encoding the fimbrial adhesin F1C of uropathogenic *E. coli* was detected only in strains of phylogenetic group B2 (4.5%).

Analysis of the occurrence of genes associated with toxin production showed that genetic markers of toxin formation were statistically significantly more frequent ($p < 0.05$) in strains of phylogenetic group B2 (46.4%) compared to strains of other phylogenetic groups.

Genetic markers responsible for synthesis of siderophores were present in strains belonging to different phylogenetic groups without significant differences.

Genes encoding the synthesis of K-antigens (*kpsMTIII*, *kps K1*, *kpsMTII*) protecting the bacterial cell from phagocytosis were statistically significantly

Occurrence of genes and virulence factors in *E. coli* strains of various phylogenetic groups

Genes and virulence factors	Phylogenetic groups											
	A (n = 9)			B1 (n = 14)			B2 (n = 112)			D (n = 59)		
	abs.	%	95% CI	abs.	%	95% CI	abs.	%	95% CI	abs.	%	95% CI
Adhesins	7	77,8	45,3–93,7	14	100,0	78,5–100	110	98,2	93,7–99,5	27	45,8	33,7–58,7
<i>fimH</i>	5	55,6	26,7–81,1	14	100,0	78,5–100	104	92,9	86,5–96,3	27	45,8	33,7–58,7
<i>pap</i>	1	11,1	2,0–43,5	2	14,3	4,0–40,0	41	36,6	28,3–45,8	1	1,7	0,03–9,0
<i>afa</i>	2	22,2	6,3–54,7	9	64,3	38,8–83,7	2	1,8	0,5–6,3	0	0	0–6,1
<i>sfa</i>	0	0,0	0–29,9	0	0,0	0–21,5	14	12,5	7,6–19,9	1	1,7	0,03–9,0
<i>focG</i>	0	0,0	0–29,9	0	0,0	0–21,5	1	4,5	0,2–4,9	0	0	0–6,1
Toxins	3	33,3	12,1–64,6	3	21,4	7,6–47,6	50	46,4	35,8–53,9	6	10,2	4,8–20,5
<i>hlyA</i>	0	0,0	0–29,9	1	7,1	1,3–31,5	28	25,0	17,9–33,8	3	5,1	1,7–13,9
<i>cnf</i>	2	22,2	6,3–54,7	0	0,0	0–21,5	22	19,6	13,3–27,9	0	0	0–6,1
<i>cvaC</i>	1	11,1	2,0–43,5	2	14,3	4,01–39,95	9	8,0	4,3–14,6	4	6,8	2,7–16,2
Invasins	0	0,0	0–29,9	0	0,0	0–21,53	3	2,7	0,92–7,58	0	0	0–6,11
<i>ibeA</i>	0	0,0	0–29,9	0	0,0	0–21,53	3	2,7	0,92–7,58	0	0	0–6,11
Siderophore	3	33,3	12,1–64,6	14	100,0	78,5–100	110	98,2	93,7–99,5	28	47,5	35,3–59,9
<i>fyuA</i>	3	33,3	12,1–64,6	11	78,6	52,4–92,4	98	87,5	80,1–92,4	23	39,0	27,6–51,7
<i>iutA</i>	2	22,2	6,3–54,7	11	78,6	52,4–92,4	91	81,3	73,0–87,4	20	33,9	23,1–46,6
Capsules	1	11,1	2,0–43,5	6	42,9	21,4–67,4	63	56,3	47,0–65,1	9	15,3	8,2–56,5
<i>kpsMTIII</i>	1	11,1	2,0–43,5	4	28,6	11,7–54,7	26	23,2	16,4–31,8	0	0	0–6,1
<i>kpsMT K1</i>	0	0,0	0–29,9	0	0,0	0–21,5	21	28,6	12,6–27,0	3	5,1	1,7–13,9
<i>kpsMTII</i>	0	0,0	0–29,9	4	28,6	11,7–54,7	31	27,7	20,2–36,6	6	10,2	4,6–20,5
Others												
<i>traT</i>	6	66,7	35,4–87,9	10	71,4	45,4–88,3	21	18,8	12,6–27,0	48	81,4	69,6–89,3
PAI	1	11,1	2,0–43,5	7	50,0	26,8–73,2	37	33,0	25,0–45,2	49	83,1	71,5–90,5

($p < 0.05$) more frequently (56.3%) present in strains of phylogenetic group B2 compared to strains of other phylogenetic groups.

The *traT* gene and pathogenicity islands (PAI) were found in comparable proportions in strains of all phylogenetic groups.

Discussion

The main difficulty in interpreting the results of the culture method in the detection of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains is presented by isolates from urine specimens, due to the lack of clearly defined criteria for assessing the etiological significance of a particular isolate, as well as due to possible contamination of the sample. True ExPEC pathogens, including UPEC, include strains containing 2 or more major virulence genes (*pap*, *sfa*, *afa*, *kpsMTII*, *iutA*). Other so-called additional genes (*fimH*, *hlyA*, *cvaC*, *cnf*, *cdtB*, *kpsMTIII*, *ibeA*, *traT* and PAI) may be potentially associated with ExPEC as they promote adaptive and competitive colonization [17, 18]. *E. coli* strains that, in addition to the main ExPEC virulence genes, have potential ones, are characterized by an increased ability to adapt to new niches, which allows them to cause a wide range of diseases.

The *E. coli* strains isolated from urine belonged to different phylogenetic groups, with the majority (88.1%) belonging to groups B2 (57.7%) and D (30.4%), which are usually associated with pathogens of extraintestinal localization [19]. Groups A and B1, with which commensal *E. coli* are associated, were assigned to 4.6 and 7.2% of strains [16]. Pathogenetically significant genetic determinants of virulence were identified in 97.9% of strains. According to the combination of 17 genes associated with adhesion (*fimH*, *pap*, *afa*, *sfa* and *fo-cG*), synthesis of siderophores (*fyuA* and *iutA*), capsules (*kpsMTII*, *kpsMTIII* and *kpsMT K1*), toxins (*hlyA*, *cnf*, *cdt* and *cvaC*), invasins (*ibeA*), providing serum resistance (*traT*), presence of pathogenicity islands (PAI), 134 individual virulence genotypes were identified. The vast majority (99.5%) of strains contained between 2 and 10 virulence genes. The results obtained about the pronounced genetic heterogeneity of UPEC strains are consistent with the data of Russian researchers [20, 21]. The study showed that 95.9% (186/194) of strains isolated from urine met the UPEC criteria — they had 3–10 genes, belonged to phylogroups B2 and D. Eight (4.1%) strains belonged to phylogroups A and B1, had no major or additional virulence genes and were considered as contaminants.

Genetic predisposition to UTI recurrence was detected in 93.3% of strains due to the presence of *fimH* adhesins encoded by the *fimH* gene, which promote UPEC persistence [5–7]. In addition to fimbrial adhesins, *afa*-encoded adhesins of the Afa/Dr family, which promote adhesion with urothelial cells, are widely distributed in UPEC. In this study, strains synthesizing afi-

brial adhesins, which, according to other researchers, have a high potential to cause pyelonephritis and recurrent cystitis, were identified in 13 patients examined in this study [22].

Meningitis-associated *E. coli* (NMEC) is a common cause of neonatal bacterial meningitis with a mortality rate of up to 40% and severe neurologic sequelae [23, 24]. Most cases of neonatal infection occur when NMEC are present in the urogenital tract of parturients, carried in the intestine, or as a complication of neonatal sepsis [25]. *Escherichia coli* sepsis is often considered as a secondary infection. One in three cases is urosepsis, which can occur in any urologic disease (urodynamic disorders in UTIs, purulent forms of pyelonephritis, urinary retention, acute prostatitis) [26]. The risk of sepsis development is increased in the infectious process caused by *E. coli* strains that contain P-pili and S-fimbriae, producing hemolysin, cytotoxic factor and synthesizing capsular antigen K2 [8, 14]. Markers of unfavorable prognosis of UTI course were found in 12% of strains, 10.7% of which had genetic determinants associated with the development of sepsis (urosepsis), 1.3% with meningitis.

The presence of rather contradictory results in the application of the traditional bacteriological method of laboratory research makes us critically reevaluate its diagnostic significance in favor of the undoubtedly promising molecular genetic method. The generally accepted practice of unconditionally recognizing the etiological significance of a specific isolate that is quantitatively predominant in a sample during culture looks at least questionable [27]. Nevertheless, it is impossible to abandon the generally accepted method of culturing microorganisms due to the fact that it allows obtaining information about clinically significant strains, their number and associations, assessing sensitivity to antibiotics, bacteriophages and disinfectants, as well as being an integral step in DNA isolation for subsequent molecular studies, including whole genome sequencing.

Conclusion

The study showed that detection of the gene complex in *E. coli* strains isolated from urine not only confirms the etiologic significance of the isolate, but also makes it possible to assess the pathogenic potential for the development of chronic forms and acute life-threatening complications. The revealed heterogeneity of the UPEC population indicates the necessity to optimize the algorithm and develop standards for laboratory diagnosis and prevention of complications of diseases caused by uropathogenic *E. coli*. The results of the integrative approach in the laboratory diagnosis of UTI using all adequate methods (traditional, modern, innovative), centered on the principles of evidence-based medicine, in other words, reliability of scientific evidence of their effectiveness, should be taken into account in the practice of specialists of different profiles.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Бухарин О.В., Гриценко В.А., Вялкова А.А. Факторы уропатогенности бактерий: роль в патогенезе и значение в диагностике пиелонефрита. *Нефрология и диализ*. 2001;3(4): 469–75. Bukharin O.V., Gritsenko V.A., Vyalkova A.A. Factors of uropathogenicity of bacteria: role in pathogenesis and significance in the diagnosis of pyelonephritis. *Nephrology and Dialysis*. 2001;3(4):469–75. EDN: <https://elibrary.ru/wjcefv>
2. Ali I., Rafeeq Z., Ahmed I., et al. Phylogeny, sequence-typing and virulence profile of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains from Pakistan. *BMC Infect. Dis.* 2019;19(1):620. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4258-y>
3. European Association of Urology. Guidelines on urological infection; 2018. Available at: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Urological-Infections-2018-large-text.pdf>
4. Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Генетические профили адгезии и адгезивная вариабельность уропатогенных штаммов *Escherichia coli*. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(3):481–90. Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S. Genetic adhesion profiles and adhesive variability of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(3):481–90. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GAP-1413> EDN: <https://elibrary.ru/edkmlc>
5. Hancock S.J., Lo A.W., Ve T., et al. Ucl fimbriae regulation and glycan receptor specificity contribute to gut colonisation by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 2022;18(6):e1010582. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010582>
6. Etefia E.U., Ben S.A. Virulence markers, phylogenetic evolution, and molecular techniques of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Nat. Sci. Med.* 2020;3(1):13–22. DOI: https://doi.org/10.4103/JNSM.JNSM_31_19
7. Захарова И.Н., Османов И.М., Мачнева Е.Б. и др. От бактериурии до микробиома мочевых путей: эволюция взглядов ученых и клиницистов. *Медицинский совет*. 2018;(17):168–77. Zakharova I.N., Osmanov I.M., Machneva E.B., et al. From bacteriuria to the urinary tract microbiome: the evolution of the views of researchers and clinicians. *Medical Council*. 2018;(17):168–77. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-17-168-176> EDN: <https://elibrary.ru/ylhwzv>
8. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmieciak A., et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* 2019;11:10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
9. Meza-Segura M., Zaidi M.B., Maldonado-Puga S., et al. Cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* strains causing severe diarrhoea in young Mexican children. *JMM Case Rep.* 2017;4(2):e005079. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005079>
10. Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. Virulence potential for extra-intestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans – the Trojan horse within our gut. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015;362(5):fnu061. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu061>
11. Banerjee R., Weisenhorn E., Schwartz K.J., et al. Tailoring a global iron regulon to a uropathogen. *mBio*. 2020;11(2):e00351-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00351-20>
12. Камалов А.А., Ходырева Л.А., Дударева А.А., Низов А.Н. Факторы риска развития инфекционно-воспалительного процесса нижних мочевых путей. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2015;91(2):63–7. Kamalov A.A., Khodyreva L.A., Dudareva A.A., Nizov A.N. Risk factors causing the development of infection and inflammation of the lower urinary tract. *Bulletin of Dermatology and Venereology*. 2015;91(2):63–7. DOI: <https://doi.org/10.25208/0042-4609-2015-91-2-63-67> EDN: <https://elibrary.ru/tyjeip>
13. Abe C.M., Salvador F.A., Falsetti I.N., et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008;52(3):397–406. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2008.00388.x>
14. Daga A.P., Koga V.L., Soncini J.G.M., et al. *Escherichia coli* bloodstream infections in patients at a University Hospital: virulence factors and clinical characteristics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:191. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00191>
15. Nojoomi F., Ghasemian A. The relation of phylogroups, serogroups, virulence factors and resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from children with septicemia. *New Microbes New Infect.* 2019;29:100517. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100517>
16. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66(10):4555–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>
17. Johnson J.R., Russo T.A. Molecular epidemiology of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2018;8(1). DOI: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0004-2017>
18. Russo T.A., Johnson J.R. Medical and economic impact of extra-intestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 2003;5(5): 449–56. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2)
19. Hernández-Chiñas U., Ahumada-Cota R.E., Navarro-Ocaña A., et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated during a longitudinal follow-up study of chronic urinary tract infections. *Front. Public Health*. 2023;11:1240392. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1240392>
20. Казанцев А.В., Осина Н.А., Глинская Т.О. и др. Факторы вирулентности и филогенетическая характеристика уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных на территории г. Саратова. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(4):56–60. Kazantsev A.V., Osina N.A., Glinskaya T.O., et al. Virulence factors and phylogenetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Saratov. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(4):56–60. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-4-56-60> EDN: <https://elibrary.ru/gplihe>
21. Слукин П.В., Асташкин Е.И., Асланян Е.М. и др. Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):671–84. Slukin P.V., Astashkin E.I., Aslanyan E.M., et al. Characterization of virulent *Escherichia coli* strains isolated from patients with urological infection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(6):671–84. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-134> EDN: <https://elibrary.ru/rquauu>
22. Whelan S., Lucey B., Finn K. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-associated urinary tract infections: the molecular basis for challenges to effective treatment. *Microorganisms*. 2023;11(9):2169. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092169>
23. Zhu N., Liu W., Prakash A., et al. Targeting *E. coli* invasion of the blood-brain barrier for investigating the pathogenesis and therapeutic development of *E. coli* meningitis. *Cell Microbiol.* 2020;22(10):e13231. DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.13231>
24. Rudd K.E., Johnson S.C., Agesa K.M., et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–11. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32989-7)

25. Багирова Н.С. Бактериemia истинная или ложная: значение критериев оценки клинической значимости положительной гемокультуры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015;60(8):55–61. Bagirova N.S. The true or false bacteriemia: the significance of evaluation criteria of clinical significance of positive hemoculture. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2015;60(8):55–61.
EDN: <https://elibrary.ru/uiqjnx>
26. Мельников В.Л., Митрофанова Н.Н., Суменкова А.О., Терина Н.А. Гнойно-септические осложнения в урологическом отделении стационара (обзор литературы). *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2019;(3):39–53. Mel'nikov V.L., Mitrofanova N.N., Sumenkova A.O., Terina N.A. Purulent-septic

- complications in the urology unit (literature review). *University Proceedings. Volga Region. Medical Sciences*. 2019;(3):39–53. DOI: <https://doi.org/10.21685/2072-3032-2019-3-4>
EDN: <https://elibrary.ru/wkgtvt>
27. Годовалов А.П., Николаева Н.В., Карпунина Т.И., Оборин Д.А. К оценке этиологической значимости бактерий, детектированных в генитальном тракте мужчин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):428–35. Godovalov A.P., Nikolaeva N.V., Karpunina T.I., Oborin D.A. On the assessment of the etiological significance of bacteria detected in the male genital tract. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(4):428–35. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-257>
EDN: <https://elibrary.ru/npmvrv>

Information about the authors

Mariia A. Makarova[✉] — D. Sci. (Med.), senior researcher, 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, makmaria@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Zoya N. Matveeva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7173-2255>

Lidiya A. Kaftyreva — D. Sci. (Med.), senior researcher, Head, Microbiology department, 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>

Author contribution: *Makarova M.A.* — idea formation, development of the concept and design of the study, conducting the study, preparing and editing the text of the article; *Matveeva Z.N.* — analysis and interpretation of the data obtained, editing the text of the article, critical revision with the introduction of valuable comments of intellectual content; *Kaftyreva L.A.* — development of scientific design, approval of the final version of the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 05.01.2024;
accepted for publication 21.02.2024;
published 28.02.2024

Информация об авторах

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

Матвеева Зоя Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. кишечных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7173-2255>

Кафтырева Лидия Алексеевна — д.м.н., в.н.с., зав. отделом микробиологии 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>

Участие авторов: *Макарова М.А.* — формирование идеи, разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, подготовка и редактирование текста статьи; *Матвеева З.Н.* — анализ и интерпретация полученных данных, редактирование текста статьи, критический пересмотр с внесением ценного замечания интеллектуального содержания; *Кафтырева Л.А.* — разработка научного дизайна, утверждение окончательного варианта статьи.

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.01.2024;
принята к публикации 21.02.2024;
опубликована 28.02.2024

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-419>

Multilocus sequence-typing scheme for *Borrelia miyamotoi* — the erythema-free ixodid tick-borne borreliosis pathogens

Konstantin O. Mironov[✉], Anton V. Titkov, Konstantin V. Kuleshov, Alexander E. Platonov

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Borrelia miyamotoi* is a pathogen of erythema-free ixodid tick-borne borreliosis (ITBB), a disease widespread in Russia. To date, there are no generally accepted methods for *B. miyamotoi* genotyping. The multilocus sequencing typing (MLST) scheme of *Borrelia* was originally developed for *B. burgdorferi*, and does not have the required discrimination power for monitoring the ITBB pathogens.

The objective of this study is to develop the MLST scheme for *B. miyamotoi*.

Materials and Methods. The whole genome sequences of 10 reference strains (GenBank) were analyzed for the selection of the house-keeping loci. The MLST scheme development was based on principles published by the authors of the method. For this experiment, 81 *B. miyamotoi* strains and positive clinical samples were used to test the MLST scheme.

Results. After analyzing the genomic data, 8 house-keeping loci were chosen for MLST, for which the PCR and sequencing primers were designed. Each MLST loci was represented by several alleles (from 4 to 7) which form 15 sequence types. The genetic diversity of pathogens isolated from ITBB patients and ticks were characterized.

Discussion. Based on pairwise distances between allelic profiles, the sequence types can be classified into four groups. The first two groups are clonal complexes; the other two groups are formed by once identified sequence types. The first clonal complex unites 11 sequence types (80 or 88% of the characterized *B. miyamotoi*), the second consists of 2 sequence types (9 or 9.8%). The genetic differences between *B. miyamotoi* are associated with the sources of strains and biological isolates. The MLST based classification confirms the previously described genetic heterogeneity of *B. miyamotoi* populations associated with ecologically unrelated vectors of ITBB pathogens.

Conclusion. The proposed MLST scheme is an appropriate tool for ITBB pathogen classification and evolutionary change characterization within clonal complexes.

Keywords: *Ixodes tick-borne borreliosis*, *Borrelia miyamotoi*, clonal complex, multilocus sequence typing, sequence type

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committees of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 83, 26.06.2018).

Acknowledgements. Our gratitude extends to all researchers, clinicians and epidemiologists who participated in the collection of biological samples used in this study, primarily to N.M. Kolyasnikova, M.G. Toporkova, D.S. Sarkysyan, S.Yu. Kovalev, E.I. Krasnova, V.A. Rahr, V.I. Chernykh, N.S. Minoranskaya, A.P. Kulagina, S.A. Rudakova, N.V. Rudakov, E.I. Bondarenko, T.A. Chekanova and M. Novakova.

Funding source. In 2018–2019 the study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 15-15-00072П). In 2020–2023 the research was supported by the state assignment topic «Improvement of the epidemiological monitoring system in the Russian Federation for natural focal vector-borne infections of bacterial nature» (Reg. No.: AAAA-A21-121011890133-8).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All reagents for PCR and «AmpliSens® *Borrelia miyamotoi*-FL» kit were produced at the Central Research Institute for Epidemiology.

For citation: Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., Platonov A.E. Multilocus sequencing-typing scheme for characterization of *Borrelia miyamotoi* — the erythema-free ixoid tick-borreliosis pathogens. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):80–88.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-419>

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

Схема мультилокусного секвенирования-типирования для характеристики *Borrelia miyamotoi* — возбудителей безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза

Миронов К.О.[✉], Титков А.В., Кулешов К.В., Платонов А.Е.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Borrelia miyamotoi* — возбудитель безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ) — широко распространённого в России заболевания. В настоящее время не существует общепринятых методик для внутривидовой характеристики *B. miyamotoi*. Схема мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) боррелий изначально была разработана для *B. burgdorferi* и не обладает необходимой дискриминирующей способностью для мониторинга возбудителей ИКБ-БМ.

Цель работы — разработка и апробация схемы МЛСТ *B. miyamotoi*.

Материалы и методы. Выбор фрагментов для МЛСТ основан на полногеномных последовательностях 10 референсных штаммов (GenBank). Схему МЛСТ разработали в соответствии с принципами, опубликованными авторами метода. Для апробации схемы МЛСТ использовали 81 биологический образец, содержащий ДНК *B. miyamotoi*.

Результаты. После анализа геномных данных выбрали 8 фрагментов генов, для которых провели дизайн праймеров для ПЦР и секвенирования. Фрагменты генов представлены несколькими аллелями (от 4 до 7), которые образуют 15 сиквенса-типов, на основании анализа которых охарактеризовали генетическое разнообразие возбудителей, выделенных от больных ИКБ-БМ и от переносчиков.

Обсуждение. На основании количества несовпадений в аллельных профилях сиквенса-типы могут быть классифицированы на 4 группы. Первым двум соответствуют клональные комплексы, две другие образованы однократно выявленными сиквенса-типами. Первый клональный комплекс (I) объединяет 11 сиквенса-типов (80 или 88% охарактеризованных *B. miyamotoi*), второй (II) — 2 сиквенса-типа (9 или 9,8%). Выявленные генетические отличия *B. miyamotoi* связаны с источниками штаммов и биологических образцов. Предложенная на основании МЛСТ классификация подтверждает продемонстрированную ранее генетическую гетерогенность популяций *B. miyamotoi*, обусловленную экологически не связанными переносчиками возбудителей ИКБ-БМ.

Заключение. Предложенная схема МЛСТ является удобным инструментом для мониторинга возбудителей ИКБ-БМ, выделенных из разных источников, и для характеристики эволюционных изменений в определённых клональных комплексах.

Ключевые слова: *Borrelia miyamotoi*, иксодовые клещевые боррелиозы, клональный комплекс, мультилокусное секвенирование-типирование, сиквенса-тип

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

Благодарность. Авторы признательны всем исследователям, клиницистам и эпидемиологам, участвовавшим в сборе биологических образцов, использованных в настоящей работе, в первую очередь Н.М. Колясниковой, М.Г. Топорковой, Д.С. Сарксяну, С.Ю. Ковалеву, Е.И. Красновой, В.А. Рар, В.И. Черных, Н.С. Миноранской, А.П. Кулагинной, С.А. Рудаковой, Н.В. Рудакову, Е.И. Бондаренко, Т.А. Чекановой и М. Новаковой.

Источник финансирования. В 2018–2019 гг. исследование выполнялось за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00072П). В 2020–2023 гг. исследование выполнялось в рамках темы НИО-КР государственного задания «Совершенствование системы эпидемиологического мониторинга в Российской Федерации за природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями бактериальной природы (клещевые возвратные лихорадки, риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки, коксиеллез, бартонеллез)» (рег. № АААА-А21-121011890133-8).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. В работе использовали наборы реагентов и реактивы «АмплиСенс» производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для цитирования: Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Платонов А.Е. Схема мультилокусного секвенирования-типирования для характеристики *Borrelia miyamotoi* — возбудителей безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):80–88.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-419>

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

Introduction

Borrelia miyamotoi is the pathogen of the erythematous form of ixodid tick-borreliosis (ITBB) which belongs to the group of relapsing fever pathogens, but is transmitted by ticks of the *Ixodes* genus. The history of discovery, taxonomy, biological properties of pathogens, aspects of pathogenesis, clinic and epidemiology of ITBB were published in a monograph by A.E. Platonov in 2017 [1]. A relevant area of *B. miyamotoi* research is the development of intraspecies pathogen classification methods. This is due to the necessity to study the clinical features of ITBB caused by different genetic variants of the pathogen, including those associated with the phenomenon of immune evasion [1], as well as the necessity to solve classical epidemiological problems related to monitoring pathogens. Because of the severely limited use of mass parallel sequencing, which is primarily due to the difficulty of culturing *B. miyamotoi*, as well as the low concentration of pathogens in the biological material sample, there is a necessity to develop affordable polymerase chain reaction (PCR)-based and fragment sequencing-based methods for antigenic and genetic characterization of ITBB pathogens.

To characterize the antigenic diversity of *B. miyamotoi*, we have proposed a method of determining the main surface proteins [2, 3], which allows simultaneous detection of several antigenic variants and identification of the most clinically and epidemiologically significant variants of ITBB pathogens circulating in Russia. However, antigen detection cannot be used for the study of evolutionary processes occurring in the bacterial population to identify pathogens with increased virulent or pathogenic properties.

The triple-locus typing scheme based on the sequencing of *p66*, *glpQ*, and *16S* gene fragments [4], proposed earlier by domestic researchers could be used to characterize representatives of the *Borrelia* genus, but this scheme does not have the necessary discrimination power for *B. miyamotoi*.

A convenient tool for studying the genetic properties of pathogens that are not under immune system pressure, allowing identification of individual strains and characterization of their genetic relationships, is the method of multilocus sequencing typing (MLST), which has been successfully used in epidemiological practice since 1998 [5, 6]. In addition to the previously demonstrated advantages of using multiple genetic loci in analyzing genetic relationships of pathogens, an important advantage of MLST is the absolute inter-laboratory reproducibility of the results, which allows combining genetic and epidemiologic information into a single database [7]. Currently, the PubMLST Internet resource contains information on MLST schemes for more than 130 species of microorganisms; for many species, published MLST schemes are the golden standard for their intraspecific characterization. At the same

time, the developed MLST scheme for bacteria of the *Borrelia* genus and its modifications do not have sufficient discrimination power to differentiate *B. miyamotoi*. This is due to the fact that the MLST scheme was initially developed for *B. burgdorferi* [8], which does not allow its use for monitoring Russian ITBB pathogens. Since the *B. miyamotoi* genome has significant differences from bacteria of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, additional analysis of available whole-genome sequences is necessary in order to develop and validate the *B. miyamotoi* MLST methodology.

Materials and methods

Nucleotide sequences

When selecting sequences for MLST, we used whole genome sequences of 6 Russian strains — Izh-4 (GenBank identification number CP024390.2, number in the State Collection of Pathogenic Microorganisms and Cell Cultures "SCPM-Obolensk" B-8324), Izh-5 (CP024205.2, B-8325), Izh-14 (CP024371.2, B-8326), Izh-16 (CP024351.2, B-8327), Yekat-1 (CP024333.2, B-8328), Yekat-6 (CP024316.2, B-8329) [1, 9] as well as 4 foreign strains – FR64b (CP004217.2), HT-31 (CP114703.1), LB-2001 (CP114690.1) and CA17-2241 (CP021872.1) [1, 10, 11], known since the beginning of the study.

Strains and samples of biological material

During development, the MLST scheme was tested on 7 strains, NL-IR-1 (CP044783.1), Yekat-18 (CP037471.1, B-8810), Yekat-76 (CP037058.1, B-8814), Yekat-19 (CP036557.1, B-8811), Yekat-17 (CP037215.2, B-8330), Yekat-21 (CP036914.2, B-8812), Yekat-31 (CP036726.1, B-8813) and 81 *B. miyamotoi* DNA samples isolated in 2012–2022 from 50 tick suspensions and the blood of 31 ITBB patients. The suspensions were obtained from *Ixodes* vector ticks collected in Western Europe and European regions of Russia (*I. ricinus*), as well as central and eastern regions of Russia (*I. persulcatus*). Most of the biological samples were obtained and characterized during the development of a methodology for determining the *B. miyamotoi* main surface protein antigenic properties [2]. The study was conducted with voluntary informed consent of patients. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor (protocol No. 83 of 26.06.2018).

Furthermore, 9 strains whose whole-genome sequences were used to select MLST loci were studied. The characteristics of the studied strains and biological material samples are given in **Table 1**.

PCR and sequencing

DNA extraction and PCR were performed using reagents produced by the Central Research Institute of

Epidemiology of Rospotrebnadzor. Amplification and sequencing of gene fragments were performed with primers (Table 2) according to the following procedure: 95°C — 15 min (1 cycle), 95°C — 10 s, 60°C — 20 s, 72°C — 20 s (40 cycles). The PCR and sequencing methods carried out with the help of Applied Biosystems equipment and reagents were similar to those used in previous studies [2, 12].

Analysis of MLST data

Sequencing results with allele designations and sequence types (ST) were processed in accordance with the method developer requirements [5–7]. ST analysis

using BURST and UPGMA algorithms and genetic tree construction were carried out using the "START2 v. 1.0.5" software [13].

Results

In accordance with the MLST principles, the selection of DNA fragments for allele designation (MLST loci) was subject to the following conditions: the fragments should be located in unlinked genes within the chromosome and represented by several alleles; furthermore, the combinations of alleles should allow for intraspecies pathogen classification [5, 6]. Whole-genome sequence analysis of 6 strains allowed us to iden-

Table 1. The *B. miyamotoi* DNA samples sources and their genetic characteristics (sequence types and clonal complex)

DNA source	Sequence type	Clonal complex	Territory	Years	Number of samples
Blood of patients with ixodid tick-borne borreliosis caused by <i>B. miyamotoi</i> (n = 37)	ST-1*	I	Sverdlovsk Region Udmurt Republic	2016–2018 2016	19 1
	ST-2*	I	Sverdlovsk Region Udmurt Republic	2017 2016	2 1
	ST-3	I	Udmurt Republic	2016	1
	ST-4	I	Sverdlovsk Region	2016	1
	ST-5*	I	Udmurt Republic	2016	1
	ST-12*	I	Sverdlovsk Region Krasnoyarsk Territory	2017 2017	1 1
	ST-13	I	Sverdlovsk region	2017	1
	ST-14*	I	Novosibirsk Region	2012	1
			Khabarovsk Territory	2012	2
Sverdlovsk Region Krasnoyarsk Territory			2017 2017, 2019	2 3	
Suspensions of ticks of <i>Ixodes</i> genus (n = 54)	ST-1*	I	Novosibirsk Region Sverdlovsk Region Samara Region Omsk Region	2014, 2017 2013–2014 2019 2022	4 3 1 5
	ST-2*	I	Altai Republic Samara Region	2016 2019	1 1
	ST-5*	I	Omsk Region	2022	1
	ST-6	I	Japan	1992	1
	ST-7	I	Japan	1990	1
	ST-8	–	Connecticut, USA	2001	1
	ST-9	–	California, USA	2015	1
	ST-10	II	Netherlands	2018	1
			Czech Republic	2019	6
			Kabardino-Balkarian Republic	2021	1
	ST-11	II	Kabardino-Balkarian Republic	2021	1
	ST-12*	I	Novosibirsk Region Omsk Region	2017 2022	4 3
			Altai Republic Amur Region	2016 2016	6 1
	ST-14*	I	Novosibirsk Region Omsk Region	2017 2022	9 1
			Tomsk Region	2014	1

Note. *Sequence types found both in patient samples and ticks.

tify several dozen groups of unlinked genetic loci, 8 of which were sequentially selected (Table 2), allowing us to differentiate epidemiologically unrelated strains which were isolated at different times, in different territories, and from different sources. Table 3 presents our proposed allele designations and profiles that determine ST strains and *B. miyamotoi* DNA in biological samples. For allele designations, the MLST loci coordinates in the whole-genome nucleotide sequences of the reference strains are given, except for the *nusB-6* and *lysM-7* alleles, for which identification numbers in the GenBank database are given. Differences in the MLST loci are represented by single-nucleotide substitutions, except for the *nusB* fragment, for which 2 alleles (*nusB-4* and *nusB-6* in ST-10 and ST-11 allele profiles) containing a 6-nucleotide insertion were identified.

When developing the *in silico* MLST scheme, 9 STs were found in 10 strains. Sequencing of gene fragments included in the MLST scheme was performed for 9 strains, and no discordant results were found in comparison with the data of whole-genome sequencing presented in GenBank. Further analysis of nucleotide sequences from DNA samples revealed 6 more STs, of which 2 were formed by two new alleles and 4 by new combinations of previously identified alleles. ST-1 (33; 36%) and ST-14 (25; 27.4%) were the most frequent in the studied sample, ST-12 (9; 10%), ST-10 (8; 9%), ST-2 (5; 5.5%) and ST-5 (2; 2.2%) were less frequent. ST-3, ST-4, ST-6, ST-7, ST-8, ST-9, ST-11, ST-13 and ST-15 occurred once (1.1% each).

The figure presents a dendrogram illustrating the genetic relationships of ST. The dendrogram and the results presented in Table 1 combine data on 91 representatives of the *B. miyamotoi* species from different sources.

Discussion

The genetic relationships of *B. miyamotoi* presented in the figure, the determination of which was based on the analysis of the number of mismatches in allelic profiles, allow us to classify the designated STs into 4 groups. The first 2 groups correspond to the clonal complexes labeled I and II in the figure, the other 2 groups are formed by ST-8 and ST-9, which have differences in all 8 loci from each other and from the other STs.

The first clonal complex (I) brings together 11 STs which are found in 80 (88%) of the characterized strains and DNA samples. ST-14 can be designated as the central one, because the allelic profile corresponding to it has the maximum number of mismatches at 1 MLST locus from the allelic profiles of other STs of this clonal complex, equal to 4. The second clonal complex (II) is formed by ST-10 and ST-11 which are found in 8 (8.7%) DNA samples and 1 (1.1%) strain. The allelic profiles of ST-10 and ST-11 have mismatches at 1 MLST locus and differ from the allelic profiles of the first clonal complex STs at all 8 MLST loci.

Table 1 presents STs and characterization of *B. miyamotoi* DNA sources. Most of the characterized DNA samples have STs found both in samples from ITBB patients and in tick suspensions. ST-3, ST-4, and ST-13 found once in ITBB pathogens and ST-6, ST-7, ST-11, and ST-15 found in tick suspensions do not allow the determination of specific genotypes associated with ITBB cases. Presumably, all representatives of the first clonal complex found in vectors can cause ITBB.

The pronounced genetic differences of characterized *B. miyamotoi* are related to the *B. miyamotoi* DNA sources. All the pathogens included in the first clonal complex were isolated from *I. persulcatus* tick

Table 2. Fragments of genes for MLST, PCR and sequencing primers

Fragment name	Protein*	5'-3' primer sequences	The length of the PCR products, bp	The length of the MLST loci, bp
<i>acpS</i>	holo-ACP synthase	gACgAAATCAATAggATgTgATATAATAAAggT CTATTACAAATgCAATAgAgTACTCCCTTTCA	365	192
<i>nusB</i>	Transcription antitermination factor NusB	ggATTTAAgACATAAggCTAgAgTTTTAgCTTTTC gAgCTCTCCATATTTTTTAAACAAAgCATCAAg	417	380
<i>motB</i>	Flagellar motor protein MotB	CCTgAATATATgTTgACATATggAgACATggTT CCTgCAAATCCAgATACCTCAAATTTACTC	623	413
<i>dnaX</i>	DNA polymerase III subunit gamma/tau	CTgCTATTAAGAAgCgTCCCAgAgAT CTgATCAAAAAGgTATAAgCATCCCTTACAC	653	560
<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	gTATAgAAAAGAAgCAAAGAgAAgACTgTCA CACCTCAAATCTCgCCTTATCACAAATATAg	393	269
<i>cdd</i>	Cytidine deaminase	GAAGCTGCAAGAAATAATGCATATTCACCAT GCTGCATAATCCTATTATTTGTAAAGATAGC	620	233
<i>lysM</i>	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	gACTTgATCCTggTgCTATTgTAAAgCTAg CCCgATCTCTAAgCTTAgAAgATCTAATTgC	624	522
<i>miaA</i>	tRNA (adenosine(37)-N6)-dimethylallyltransferase MiaA	TCCTACgggTgTAggTAAAgTgACATT CCTCTTCAAgCAATCCACAATCAATC	626	555

Note. *The designation of the protein from NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). **The nucleotide positions of MLST loci in the reference strains were presented in the Table 3.

Table 3. Designations of alleles and sequence types

DNA source	Fragments (length, bp)***									Sequence type
	<i>acpS</i> (192)	<i>nusB</i> (380, 386)	<i>motB</i> (413)	<i>dnaX</i> (560)	<i>rplP</i> (269)	<i>cdd</i> (233)	<i>lysM</i> (522)	<i>miaA</i> (555)		
Strains**	Yekat-1*	1 896361– 896170	1 800974– 801353	1 613232– 613644	1 423437– 423996	1 404829– 405097	1 265228– 265460	1 253627– 254148	1 37083– 37637	ST-1
	Izh-14	1	1	1	1	2 404724– 404992	1	1	1	ST-2
	Izh-4	1	1	1	1	1	1	2 253612– 254133	2 37068– 37622	ST-3
	Yekat-6	1	2 800953– 801332	2 613211– 613623	1	1	1	1	1	ST-4
	Izh-5	2 896194– 896385	1	1	2 423437– 423996	1	2 265228– 265460	1	1	ST-5
	FR64b	2	1	1	2	1	1	3 650921– 651442	1	ST-6
	HT31	2	1	1	2	1	1	1	3 37098– 37652	ST-7
	LB-2001	3 897013– 897204	3 801812– 802191	3 613265– 613677	3 423552– 424111	3 404960– 405228	3 265566– 265798	4 253956– 254477	4 37153– 37707	ST-8
	CA17-2241	5 10054– 10245	5 105075– 105454	5 292933– 293345	6 482530– 483089	5 501393– 501661	5 640132– 640364	6 651447– 651968	6 868175– 868729	ST-9
	NL-IR-1	4 893710– 893901	4 798494– 798879	4 611883– 612295	4 422636– 423195	4 404082– 404350	4 265475– 265707	5 253875– 254396	5 37104– 37658	ST-10
DNA samples	136_KBR21	4	6	4	4	4	4	5	5	ST-11
	Bal_Y17	2	1	1	1	1	1	1	1	ST-12
	Sha_Y17	1	1	1	1	1	1	1	2	ST-13
	4426_Y17	2	1	1	2	1	1	1	1	ST-14
	2154_T14	2	1	1	1	1	1	7	1	ST-15

Note. *The Izh-16 strain is assigned to ST-1. **Alleles and sequence types of the first nine strains were designated based on the whole genome sequences, allelic profiles of the NL-IR-1 strain and isolates were obtained by testing the MLST scheme. ***For the unique alleles the nucleotide positions of MLST loci in the reference strains sequences described in Material and Methods section are indicated. The alleles *nusB*-6 and *lysM*-7 have identification numbers in the GenBank database OR192576 and OR134830, respectively.

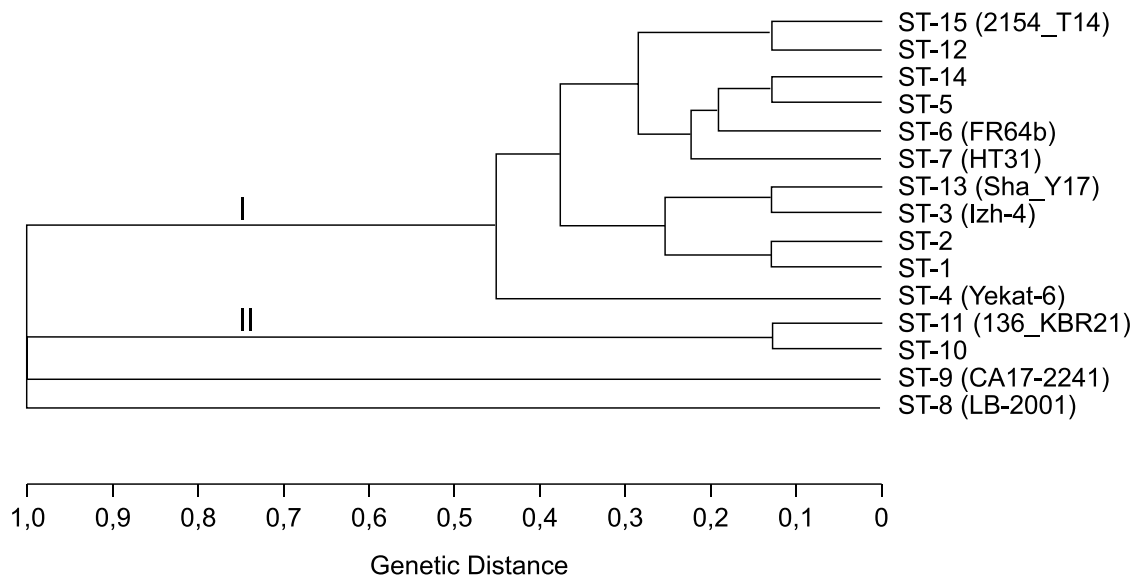
suspensions obtained in Russia. The first clonal complex also contains strains FR64b and HT31 isolated in Japan from the same vector species. STs included in the second clonal complex were found in *I. ricinus* tick suspensions obtained from European countries and in the Kabardino-Balkar Republic. ST-8 and ST-9 *B. miyamotoi* were isolated from ticks of *I. scapularis* and *I. pacificus* species, respectively, distributed in North America.

Thus, the proposed classification based on MLST confirms the previously demonstrated genetic heterogeneity of *B. miyamotoi* populations corresponding to Asian (clonal complex I), European (clonal complex II)

and American (ST not included in clonal complexes I and II) genotypes [1, 14, 15], circulating in different continents, which is associated with ecologically unrelated vectors of the pathogens.

Conclusion

In this study, based on the available whole-genome data, an MLST scheme was developed to differentiate *B. miyamotoi* pathogens collected in different territories. By the example of the first ST clonal complex distribution, it is possible to draw a conclusion about the most common variants of *B. miyamotoi* circulating in Russia and some foreign countries. This approach may



Genetic relationships of sequence types within the *B. miyamotoi* species based on allelic profiles differences (the UPGMA algorithm).

The number in parentheses is the strain or isolates name for the sequence types found once. The Roman numeral is the designation of clonal complexes.

become a convenient tool for monitoring the pathogens of ITBB and characterizing evolutionary changes in the described clonal complexes. The use of MLST involves the examination of biological material samples after qualitative detection of *B. miyamotoi* DNA or obtaining a culture of the pathogen. Due to the complexity of *B. miyamotoi* cultivation, the bulk of *B. miyamotoi* pathogens can be characterized using MLST and the rest are characterized with the help of whole-genome sequencing, which at the present stage is necessary for a thorough analysis of evolutionary changes occurring in bacterial populations.

Further studies should be focused on expanding the selection of characterized isolates, including validation of the developed *in silico* MLST scheme using nucleotide sequence information published in GenBank, as well as searching for possible relationships between the described *B. miyamotoi* ST and antigenic variants determined with the help of the main surface protein typing data [2]. After extended testing of the proposed MLST scheme, the possibility of combining all the obtained data into a common database, similar to existing standards for intraspecific characterization of other pathogens, may be considered [7].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Платонов А.Е. «Новая» инфекция, вызываемая *Borrelia miyamotoi*: микробиология, эпидемиология, диагностика, клиника и патогенез. М.;2017. Platonov A.E. A «New» Infection Caused by *Borrelia miyamotoi*: Microbiology, Epidemiology, Diagnostics, Clinic and Pathogenesis. Moscow;2017. EDN: <https://elibrary.ru/yabqrq>
2. Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В. и др. Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(3):339–50. Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., et al. Development and application of the technique for identification of *Borrelia miyamotoi* surface antigens. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):339–50. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-142> EDN: <https://elibrary.ru/kmeswh>
3. Миронов К.О., Титков А.В., Платонов А.Е. Комплекс молекулярно-биологических методик для внутривидовой характеристики бактерий вида *Borrelia miyamotoi*. Национальные приоритеты России. 2021;42(3):208–11. Mironov K.O., Titkov A.V., Platonov A.E. Complex of molecular biological techniques for *Borrelia miyamotoi* typing. *National Priorities of Russia*. 2021;42(3):208–11. EDN: <https://elibrary.ru/kmeswh>
4. Фоменко Н.В., Боргояков В.Ю., Панов В.В. Генетические особенности ДНК боррелий вида *Borrelia miyamotoi*, выявляемых в таежных клещах. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011;(2):12–7. Fomenko N.V., Borgoyakov V.Yu., Panov V.V. Genetic features of DNA of *Borrelia miyamotoi* transmitted by *Ixodes persulcatus*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2011;(2):12–7. EDN: <https://elibrary.ru/nwewlr>
5. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998;95(6):3140–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
6. Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Платонова О.В. Мультилокусное секвенирование — новый метод генотипирования бактерий и первые результаты его применения. Генетика. 2000;36(5):597–605. Platonov A.E., Shipulin G.A., Platonova O.V. Multilocus sequence typing: a new method and the first results in the genotyping of bacteria. *Genetika*. 2000;36(5):597–605. EDN: <https://elibrary.ru/mpfxxb>
7. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3:124. DOI: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
8. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008;105(25):8730–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105>
9. Kuleshov K.V., Koetsveld J., Goptar I.A., et al. Whole-genome sequencing of six *Borrelia miyamotoi* clinical strains isolated in Russia. *Genome Announc*. 2018;6(1):e01424-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01424-17>
10. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1995;45(4):804–10. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-804>
11. Kingry L.C., Replogle A., Dolan M., et al. Chromosome and large linear plasmid sequences of a *Borrelia miyamotoi* strain isolated from *Ixodes pacificus* ticks from California. *Genome Announc*. 2017;5(37):e00960-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00960-17>
12. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., Шипулин Г.А. Анализ московской популяции штаммов *Neisseria meningitidis* методом мультилокусного секвенирования-типирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;93(2):31–6. Mironov K.O., Platonov A.E., Koroleva I.S., Shipulin G.A. Analysis of the Moscow population of *Neisseria meningitidis* strains by the method of multilocus sequencing-typing. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2006;93(2):31–6. EDN: <https://elibrary.ru/htqatx>
13. Jolley K.A., Feil E.J., Chan M.S., Maiden M.C. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics*. 2001;17(12):1230–1. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1230>
14. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis*. 2011;17(10):1816–23. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1710.101474> EDN: <https://elibrary.ru/pbdedx>
15. Crowder C.D., Carolan H.E., Rounds M.A., et al. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* ticks in Europe and the United States. *Emerg. Infect. Dis*. 2014;20(10):1678–82. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2010.131583>

Information about the authors

Konstantin O. Mironov[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of molecular methods for genetic polymorphisms research, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Anton V. Titkov — researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-9267>

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

Alexander E. Platonov — D. Sci. (Biol.), Prof., chief researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

Author contribution: *Mironov K.O.* — laboratory methods and experiments design for MLST, data analysis, writing the text; *Titkov A.V.* — collection and processing of samples, experiments performing, data analysis, editing; *Kuleshov K.V.* — sequences analysis and MLST loci selection; *Platonov A.E.* — MLST scheme development, concept and design 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 15.11.2023;
accepted for publication 28.12.2023;
published 28.02.2024

Информация об авторах

Миронов Константин Олегович[✉] — д.м.н., зав. лаб. молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Титков Антон Владимирович — н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-9267>

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

Платонов Александр Евгеньевич — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

Участие авторов: *Миронов К.О.* — создание лабораторной методики для схемы МЛСТ, дизайн экспериментов и анализ данных, написание текста; *Титков А.В.* — сбор биологического материала, постановка экспериментов, анализ данных, редактирование текста; *Кулешов К.В.* — анализ результатов секвенирования, выбор фрагментов для МЛСТ; *Платонов А.Е.* — разработка схемы МЛСТ, концепция и дизайн 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 15.11.2023;
принята к публикации 28.12.2023;
опубликована 28.02.2024



Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* carriage in the pediatric population

Guzel Sh. Isaeva^{1,2✉}, Albina Z. Zaripova^{2,3}, Lira T. Bayazitova^{1,2}, Ralina M. Khusainova^{1,2},
Tatiana A. Chazova¹, Olga F. Tyupkina¹, Ekaterina V. Nikitina⁴, Irina A. Tsvetkova^{4,5}

¹Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia;

²Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

³Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russia;

⁴Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia;

⁵St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia

Abstract

Objective: to investigate the regional peculiarities of *Streptococcus pneumoniae* carriage in the pediatric population and characterize the dominant serotypes of the pathogen.

Materials and methods. The clinical study group consisted of 509 healthy children attending preschool institutions. Examination of nasopharyngeal samples for the detection of *S. pneumoniae* was carried out by classical bacteriological and molecular biological methods. The serotype was determined by real-time PCR. Genome-wide sequencing of the serogroups 15 and 11 isolates and bioinformatic analysis were performed.

Results. The *S. pneumoniae* bacterial carriers in the group of healthy children was detected in 207 children (40.7%), while the frequency of detection of *S. pneumoniae* in urban children living in Kazan was significantly higher than in children living in rural area and amounted to 53.4 and 31.1%, respectively ($p < 0.05$). Among children vaccinated with the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-13), *S. pneumoniae* carriers were not detected in 57.5% of cases. There were no significant differences in the degree of nasopharyngeal contamination depending on the vaccination status. Analysis of the serotype composition indicates the predominance of vaccine serotypes (57.7%), while the share of serotypes included in the PCV-13 vaccine accounts for only 24.7%, the share of non-vaccine serotypes was 32.1%, untyped — 10.2%. In unvaccinated children, vaccine serotypes that are part of the PCV-13 and 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine prevailed (PPSV-23): 6ABCD (21%), 11 AD (15%), 14 (13%). In vaccinated children, serotypes not included in the active vaccines dominated: 15AF (17.4%), 23A (19.2%), as well as 11AD (19.6%) (11A is included in PPSV-23). The 27 Kz isolate (serotype 15C) belonged to one of the most common sequence types ST1025. The 105_Kz isolate (serotype 11D) belonged to another common sequence type ST 62.

Conclusion. In order to improve epidemiological surveillance of pneumococcal infection, it is necessary to introduce the monitoring of circulating clonal complexes of dominant *S. pneumoniae* serogroups and analyze the genetic determinants of antibiotic resistance and virulence depending on the sequence type.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, bacterial carrier, serotypes, sequence types

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 1, March 12, 2020).

Acknowledgments. The authors are sincerely grateful to colleagues from the metagenomic research group of the Epidemiology Department of the Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology (D.E. Polev et al.) for their assistance in sequencing the selected representative isolates.

Funding source. The study was conducted under the grant "Sapiens (Scientific assessment of pneumococcal infection epidemiology networks)". Sponsor of the study: Rostropovich–Vishnevskaya Charitable Foundation "For the sake of children's health and future" with the assistance of the All-Russian Public Organization "Pediatric Respiratory Society".

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

For citation: Isaeva G.Sh., Zaripova A.Z., Bayazitova L.T., Khusainova R.M., Chazova T.A., Tyupkina O.F., Nikitina E.V., Tsvetkova I.A. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* carriage in the pediatric population. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):89–99.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-445>

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

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-445>



Характеристика бактерионосительства *Streptococcus pneumoniae* в детской популяции

Исаева Г.Ш.^{1,2}, Зарипова А.З.^{2,3}, Баязитова Л.Т.^{1,2}, Хусаинова Р.М.^{1,2},
Чазова Т.А.¹, Тюпкина О.Ф.¹, Никитина Е.В.⁴, Цветкова И.А.^{4,5}

¹Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

³Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан), Казань, Россия;

⁴Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Цель: изучение региональных особенностей бактерионосительства *Streptococcus pneumoniae* в детской популяции и характеристика доминирующих серотипов возбудителя.

Материалы и методы. Обследованы 509 здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения. Исследование мазков из носоглотки на обнаружение *S. pneumoniae* проводили классическим бактериологическим и молекулярно-биологическим методами. Определение серотипа осуществляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Проведено полногеномное секвенирование изолятов серогрупп 15 и 11.

Результаты. Бактерионосительство *S. pneumoniae* в группе здоровых детей выявлено у 207 (40,7%) детей, при этом частота обнаружения *S. pneumoniae* у городских детей, проживающих в Казани, была достоверно выше, чем у сельских детей, и составила 53,4 и 31,1% соответственно ($p < 0,05$). Среди детей, вакцинированных 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакциной (ПКВ-13), в 57,5% случаев носительства *S. pneumoniae* не наблюдалось. Достоверных различий по степени обсеменённости носоглотки в зависимости от вакцинального статуса не установлено. Анализ серотипового состава указывает на преобладание вакцинных серотипов (57,7%), при этом на долю серотипов, входящих в состав вакцины ПКВ-13, приходится всего 24,7%; доля невакцинных серотипов составила 32,1%; нетипируемых — 10,2%. У невакцинированных детей преобладали вакцинные серотипы, входящие в состав ПКВ-13 и 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины (ППСВ-23): серогруппа 6ABCD (вакцинными являются серотипы 6A и 6B; 21%), 11AD (15%), 14 (13%). У вакцинированных детей доминировали серотипы, не входящие в состав действующих вакцин: 15AF (17,4%), 23A (19,2%), а также 11AD (19,6%; 11A входит в ППСВ-23). Изолят 27_Kz (серотип 15C) относился к одному из наиболее распространённых сиквенса-типов ST1025. Изолят 105_Kz (серотип 11D) относился к другому распространённому сиквенса-типу ST62.

Выводы. В целях совершенствования эпидемиологического надзора необходимо внедрение мониторинга за циркулирующими клональными комплексами доминирующих серогрупп пневмококков и проведение анализа генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности в зависимости от сиквенса-типа.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, бактерионосительство, серотипы, сиквенса-типы

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (протокол № 1 от 12.03.2020).

Благодарность. Авторы искренне признательны коллегам из группы метагеномных исследований отдела эпидемиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Д.Е. Полев и др.) за помощь в секвенировании выбранных репрезентативных изолятов.

Источник финансирования. Исследование проведено в рамках гранта «Sapiens (Scientific assessment of pneumococcal infection epidemiology networks)». Спонсор исследования: Благотворительный фонд Ростроповича–Вишневецкой «Во имя здоровья и будущего детей» при содействии Общероссийской общественной организации «Педиатрическое респираторное общество».

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

Для цитирования: Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Баязитова Л.Т., Хусаинова Р.М., Чазова Т.А., Тюпкина О.Ф., Никитина Е.В., Цветкова И.А. Характеристика бактерионосительства *Streptococcus pneumoniae* в детской популяции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):89–99.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-445>

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

Introduction

Streptococcus pneumoniae is one of the most common bacterial respiratory pathogens. Infections caused by this microorganism continue to be a pressing issue, with young children and the elderly belonging to the high-risk group [1]. According to the structure of capsular polysaccharide, 100 serotypes of *S. pneumoniae* have been identified to date [2]. The wide application of molecular genetic methods allows further differentiation of pneumococci by clones and sequences-types. The spectrum of dominant serotypes may depend on the age of the subjects and the geographic region, although similar distribution patterns have been observed in different countries. According to multicenter studies, approximately 20 serotypes account for more than 80% of invasive pneumococcal infection (IPI) cases in all age groups, with 13 of the most common serotypes responsible for 70–75% of pediatric IPI cases [3].

Pneumococcal vaccines include the most relevant serotypes that are associated with IPIs. Since the introduction of specific prophylaxis against pneumococcal infection in national childhood immunization programs, an increase in immune coverage has been observed not only among the child population but also among adults. As part of a research project to assess the shift and spread of pneumococcal pathogen serotypes, data from 44 surveillance sites (Europe, North America, Africa, Latin America, Asia and Oceania) were analyzed to examine the direct and indirect effects of routine use of childhood vaccination programs with 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines (PCV-10 and PCV-13) on the incidence of IPIs. Routine childhood immunization with PCV was observed to result in an 85% reduction in IPIs among children and adults of all ages 6 years after the vaccine introduction [3].

Despite the undoubted achievements of vaccine prophylaxis, which can be attributed to the reduction of IPIs in all age groups of vaccinated and unvaccinated individuals, there is evidence of an increase in the frequency of nasopharyngeal colonization with non-vaccine and untypable serotypes, including encapsulated strains of pneumococci. Numerous studies of PCV-13 efficacy in different regions have shown that the use of this vaccine can not only reduce the incidence of pneumococcal infection, but also cause changes in the serotype composition of circulating *S. pneumoniae* strains [4, 5].

One of the priority areas of pneumococcal infection control is conducting scientific research to study the direct and indirect effect of vaccination on the results of morbidity and bacterial carriers after the introduction of PCV to the pediatric population in different territories.

The objective of our study was to investigate regional peculiarities of *S. pneumoniae* carriage in the pediatric population and characterize the dominant serotypes of the pathogen.

Materials and methods

As part of the regional monitoring in the Republic of Tatarstan in 2020–2022, 509 children aged 3 years to 5 years 11 months and 29 days were examined in accordance with the inclusion criteria (acceptable age, parents or legal representatives signing a voluntary informed consent form). The studies were approved by the Local Ethical Committee of the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 1 of 12.03.2020). The group of healthy children ($n = 509$) included those attending preschool institutions in Kazan ($n = 204$) and Vysokaya Gora ($n = 305$), in the absence of acute respiratory disease symptoms. Vaccine status of children was studied according to their developmental checklist.

Nasopharyngeal swabs served as the main material for the study. ESwab (Copan) fluid collection and transportation system was used for collection and transportation of biomaterial. *S. pneumoniae* was determined by bacteriological and molecular-biological methods. Culturing was performed on Colombian CNA agar with 5% defibrinated sheep blood (Sredoff). Petri dishes were incubated for 18–24 h at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. *S. pneumoniae* was identified by morphological (Gram-positive diplococci), cultural (S-form colonies with alpha-hemolysis) and biochemical properties (catalase test, sensitivity to optochin and bile salts) in accordance with the methodological guidelines¹.

DNA was extracted from pure *S. pneumoniae* cultures using the AmpliSens DNA-Sorb-B Nucleic Acid Extraction Kit (InterLabService). Typing of the obtained samples by polymerase chain reaction (PCR) was carried out in two stages. The first stage was detection of marker genes of *S. pneumoniae* — *lytA* and *cpsA*; the second stage — serotype determination by real-time PCR using fluorescently labeled oligonucleotides and primers according to CDC recommendations²: 6A/B/C/D, 9A/V, 23F, 19F, 18A/B/C/F, 15A/F, 19A, 3, 12F/A/B/44/46, 7A/F, 4, 5 11A/D, 16F, 9L/N, 14, 1, 2, 22A/F, 23 A, 33A/33F/37. *S. pneumoniae* isolates that were not categorized into the studied groups were labeled as untypable.

Whole genome sequencing (WGS) was performed for 2 *S. pneumoniae* isolates, whose serotypes were determined by PCR as 15AF and 11AD. The genome analysis of the first isolate showed that it belonged to serotype 15C (*Streptococcus pneumoniae*

¹ Methodological guidelines MG 4.2. 0114-16 “Laboratory diagnosis of community-acquired pneumonia of pneumococcal etiology” (approved by the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation).

² Table 1: List of oligonucleotide primers used in 41 conventional multiplex* PCR assays for pneumococcal serotype deduction of 70 serotypes. URL: <http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-oligonucleotide-primers.pdf>

105_Kz CP125291), while the second isolate belonged to serotype 11D (*Streptococcus pneumoniae* 105_Kz CP125291). The obtained data were uploaded to GenBank (BioProject PRJNA971376 (NZ_CP126249.1) and PRJNA1009429). The choice of serotypes for sequencing is explained by the significant spread of pneumococci serogroups 15 and 11 against the background of vaccination, with only serotypes 11A, 15A and 15C included in the new PCV-20 (Pfizer) [6], serotypes 11A and 15B — in the composition of PV23.

For WGS, DNA was isolated from pure *S. pneumoniae* cultures, using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). WGS was performed on DNBSEQ-G50 (MGI) and GridION (Oxford Nanopore Technologies) platforms. Libraries for WGS were prepared using the MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set (MGI), Native Barcoding Expansion and Ligation Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies), respectively. The median length of the library fragments was 430 bp (identified using the QIAxcel Advanced System capillary gel electrophoresis system). Sequencing to obtain paired-end reads was performed on the DNBSEQ-G50 platform (MGI) using the DNBSEQ-G50RS kit (FCL PE150/FCS PE150).

The quality of the obtained nucleotide sequences was assessed using the FastQC v. 0.11.8 program (Babraham Bioinformatics). Quality read filtering and removal of PCR adapters and primers used in library preparation were performed using the Cutadapt v. 1.15 program. For *de novo* genome assembly, the SPAdes v. 3.15.4 algorithm was used [7], for hybrid assembly – Unicycler v. 0.4.7 [8]. The final quality assessment was performed using the Quast v. 5.0.2 program [9]. MLST (Multilocus sequence typing) was performed using the MLST v. 2.0 program³ [10]. Genomes were annotated using the RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology) server [11]. The CARD database was used to identify genes and mutations associated with antibiotic resistance [12]. The search for prophage sequences in the genomes of the studied isolates was performed using the Phaster online service [13], the search for pathogenicity islands in the genomes was performed using the IslandViewer v. 4 online service [14].

The results obtained during the study were processed using the Statistica for Windows v. 6.0 program system. The level of $p < 0.05$ was considered as the criterion of statistical reliability of the obtained data.

Results

S. pneumoniae bacterial carriers in the group of healthy children were detected in 207 (40.7%) children, and the frequency of *S. pneumoniae* detection in children living in Kazan was significantly higher than in children living in rural areas – 53.4 and 31.1%, respec-

tively ($p < 0.05$). When studying the vaccination status according to the development checklists, it was found that out of 509 healthy children, 315 were vaccinated with PCV-13 (**Table 1**). Of the 207 *S. pneumoniae* carriers, 134 children were vaccinated, with 43 children receiving the full course of vaccination, 47 receiving 2 doses, and 44 receiving only 1 dose.

According to the Immunoprophylaxis Republican Center, vaccination of the child population against pneumococcal infection has been conducted in the Republic of Tatarstan according to the national calendar of preventive vaccinations since 2014. The PCV-13 pneumococcal vaccine is used for vaccination in accordance with the schedule, which includes vaccination at 2, 4, 5 months and subsequent revaccination at 15 months. As of 01.01.2021, 82% of children aged 0–7 years were vaccinated with 1–3 doses of the vaccine, with the share of those who had undergone the full course of vaccination and revaccination amounting to 60.4%.

No *S. pneumoniae* bacterial carriage was observed among vaccinated children in the majority of cases (57.5%). Only 20.7% of children who underwent the full course of vaccination were found to be *S. pneumoniae* bacterial carriers ($p < 0.01$). Thus, in most cases the bacterial carriers were unvaccinated or children who had not undergone the full course of vaccination.

When studying the degree of nasopharyngeal *S. pneumoniae* contamination, it was found that low contamination (10^1 – 10^2 CFU/tampon) was observed in 62 (30%) cases, moderate contamination (10^3 – 10^4 CFU/tampon) in 113 (54.6%), high contamination (10^5 – 10^6 CFU/tampon) in 32 (15.4%). At the same time, in the groups of bacterial carrier children, both vaccinated and unvaccinated, a moderate degree of contamination prevailed, no significant differences in the degree of contamination depending on PCV-13 vaccination were found (**Table 2**).

The serotype composition of pneumococcal strains isolated from healthy children was studied and analyzed depending on the vaccine status of the bacterial carrier (**Table 3**).

The total number of identified serotypes of *S. pneumoniae* isolated from nasopharyngeal swabs exceeded the number of cultures isolated, indicating mixed colonization by several serotypes (from 2 to 4), with mixed colonization more frequently observed in vaccinated children in most cases. This phenomenon has also been observed by other researchers [15].

The results of the serotype composition analysis indicate low coverage of serotypes circulating among child carriers by pneumococcal vaccines used in Russia, and we were unable to differentiate individual serotypes within some serogroups during the study. The results obtained can be assessed as tentative and requiring further deciphering. The share of serotypes included in the PCV-13 vaccine was 24.7%, and the share of vaccine serotypes of the 23-valent pneumococcal polysac-

³ Center for Genomic Epidemiology.

URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/MLST>

Table 1. The frequency of *S. pneumoniae* bacterial carriage in vaccinated healthy children, *n* (%)

Vaccination	Number of vaccinated children	Number of children who are not <i>S. pneumoniae</i> carriers	Number of the <i>S. pneumoniae</i> carrier children
V1	108	64 (59,3%)	44 (40,7%)*
V2	115	68 (59,2%)	47 (40,8%)*
V3	92	49 (53,3%)	43 (46,7%)
Total	315	181 (57,4%)	134 (42,5%)*

Note. * $p < 0.01$ compared to the non-carrier group.

Table 2. The degree of *S. pneumoniae* contamination of the nasopharynx depending on vaccination by PCV-13, *n* (%)

The degree of contamination	Number of <i>S. pneumoniae</i> carrier children	The number of cases of <i>S. pneumoniae</i> carriage in vaccinated children	Number of cases of <i>S. pneumoniae</i> carriage in unvaccinated children	<i>p</i>
Low	62 (30%)	35 (26,2%)	27 (43,5%)	0,152
Medium	113 (54,6%)	78 (58,2%)	35 (47,1)	< 0,01
High	32 (15,4%)	21 (15,6%)	11 (34,4%)	0,013
Total	207	134 (64,7%)	73 (35,3%)	< 0,01

charide vaccine (PPSV-23), which is not used for vaccination of children, was 33%. The share of non-vaccine serotypes amounted to 32.1%, and untypable serotypes — 10.2%. Analysis of serotype composition depending on the vaccination status of the children showed significant differences in the frequency of serotypes. In unvaccinated children, serotypes belonging to vaccine serotypes prevailed — 6ABCD (21%), 11AD (15%), 14 (13%), although we were unable to differentiate vaccine and non-vaccine serotypes in several serogroups. In vaccinated children, predominant serotypes were 15AF (17.4%), 23A (19.2%), i.e. serotypes not included in current vaccines, and 11AD (19.6%), part of the serogroup, a representative of which (11A) is included in PPSV-23, which is very rarely used to prevent pneumococcal infection in children.

Of the isolates associated with the most common serogroups 15 and 11 among pediatric carriers that are not included in the PCV-13 vaccine, one representative isolate each was selected for sequencing (**Table 4**). The 27_Kz isolate (serotype 15C) belonged to sequence type ST1025. The 27_Kz genome isolate contained one intact prophage (Streptococcus phage SpSL1, NC_027396(23), 39.7 bp) and residues of 3 prophages. The 27_Kz genome contained components of phosphotransferase systems of different specificity (galactose-specific, mannitol-specific, beta-glucosidase-specific, cellobiose-specific); sortase genes; IgA1-protease gene; LanM lanthionine-containing bacteriocin synthesis genes; asparagine synthesis genes; *piaABCD* locus (encoding iron ion transporters); ABC transporter genes of different specificity (amino acids, polyamines, metal ions). Variants of the type I restriction-modification system (types of S-subunit specificity) of the 27_Kz isolate were associated with pathogenicity (based on the annotation in IslandViewer v. 4). The presence of antibiotic resistance determinants of differ-

ent classes of antibiotics was predicted using RAST-online. A variant of the *folA* dihydrofolate reductase gene associated with trimethoprim resistance was identified in the 27_Kz genome (Table 4).

The 105_Kz isolate (serotype 11D) belonged to ST62. The 105_Kz isolate genome contained residues of 4 prophages and a mobile genetic element Tn5252 containing a lantibiotic synthesis locus. The 105_Kz isolate genome also contained components of phosphotransferase systems of different specificity, soraptase genes, IgA1-protease gene, *piaABCD* locus, ABC-transporter genes of different specificity (amino acids, polyamines, metal ions). The 105_Kz isolate was characterized by the presence of cytosine-DNA methyltransferase gene (most genetic lines of *S. pneumoniae* contain adenine-DNA methyltransferases). The presence of a cytosine-specific methyltransferase that is not widely distributed among *S. pneumoniae* may explain the absence of intact prophages in the genome of this strain, and may also be related to the genetic stabilization and spread of ST62. Furthermore, the 105_Kz isolate has ATP synthase V (not F type) and may have features of energy metabolism.

Thus, based on vaccination in Russia, there is a spread of serogroups 15 and 11 in child bacterial carriers of *S. pneumoniae*, representatives of which may be associated with genetic lines that have potentially increased virulence or other adaptive changes that ensure stabilization and successful spread of these clones.

Discussion

The results of our study show that PCV-13 vaccination does not completely exclude the phenomenon of bacterial carriage among preschool children, but at the same time, children who have undergone a full course of vaccination and revaccination have significantly lower rates of bacterial carriage compared to the group

Table 3. Serotype composition of *S. pneumoniae* isolated from healthy bacterial carrier children depending on the vaccination status, *n* (%)

Vaccine	Identified serotypes	All vaccinated and unvaccinated	Unvaccinated with PCV-13	Vaccinated with PCV-13	<i>p</i>
PCV-13 vaccine serotypes	4	0	0	0	–
	6ABCD (only 6A and 6B are included in PCV-13)*	48	21 (43,75%)	27 (56,25%)	0,223
	9AV (only 9V is included in PCV-13)*	0	0	0	–
	14	20	13 (65%)	7 (35%)	0,061
	18ABCF (only 18C is included in PCV-13)*	4	0	4	–
	19F	1	0	1	–
	23F	0	0	0	–
	1	1	0	1	–
	5	0	0	0	–
	7AF (only 7F is included in PCV-13)*	0	0	0	–
	3	6	1 (16,67%)	5 (83,33%)	0,021
	19A	0	0	0	–
	PPSV-23 Vaccine serotypes	2	1	1	0
8		0	0	0	–
9LN (only 9N is included in PPSV-23)*		28	11 (39,29%)	17 (60,71%)	0,112
10A		0	0	0	–
11AD (only 11A is included in PPSV-23)*		59	15 (25,42%)	44 (74,58%)	0,214
12F		3	0	3	–
15BC (only 15B is included in PPSV-23)*		0	0	0	–
17F		0	0	0	–
22F		11	4 (36,36%)	7 (63,64%)	0,211
33F	5	0	5	–	
12AF (only 12F is included in PPSV-23)*	0	0	0	–	
Non-vaccine serotypes	15AF	49	10 (20,41%)	39 (79,59%)	0,213
	16F	1	0	1	–
	23A	54	11 (20,37%)	43 (79,63%)	0,213
Untyped serotypes	–	33	13 (39,39%)	20 (60,61%)	0,087
Total		324	100 (30,86%)	224 (69,14%)	0,216

Note. *Serotypes of some serogroups were not differentiated by real-time PCR.

of children who have not been vaccinated or undergone its full course. We have not revealed the influence of vaccination on the degree of pneumococcal colonization of the nasopharynx in healthy bacterial carriers. Possibly, the degree of colonization is influenced by other factors related to immunological features of the host, virulence of the pathogen or environmental factors, which undoubtedly requires further research.

In this study, a correlation between the frequency of bacterial carriage and the living environment of the children was established: in urban children the frequency of nasopharyngeal colonization with *S. pneumoniae* was significantly higher than in children living in rural areas, which can be explained by more frequent contact in the urban environment. These data should be taken into account when planning regional monitoring

Table 4. Characteristics of genomes of serotypes 15C and 11D isolates obtained from nasopharyngeal swabs of children with identified *S. pneumoniae* carriage

Sample	Genbank accession number	Year of isolation	Serotype	Sequence type	Patient's age, years	PEN	ERY	TET	CHL	TXT
27_Kz	NZ_CP126249.1	2020	15C	1025	3	S	S	S	S	R
105_Kz	PRJNA1009429	2020	11D	62	4	S	S	S	S	S

Note. PEN — penicillin; ERY — erythromycin; TET — tetracycline; CHL — chloramphenicol; TXT — co-trimoxazole; R — presence, S — absence of resistance determinants.

Source: Prediction of antimicrobial resistance in PATRIC and RAST. URL: <https://www.bv-brc.org/job>

studies of *S. pneumoniae* circulation among different groups of the pediatric population. Monitoring studies conducted in different countries indicate the existence of common patterns in the distribution of *S. pneumoniae* serotype composition after the introduction of routine immunization. For example, in Portugal, PCV-13 has been available since 2010, after a decade of using PCV-7. S. Felix et al. evaluated changes in the serotype distribution and antimicrobial susceptibility of pneumococcal pneumococci carried by children living in two regions of Portugal (one urban and one rural) over 3 epidemiologic periods: before the introduction of PCV-13 (2009–2010), the early PCV-13 period (2011–2012), and the late PCV-13 period (2015–2016) [16]. Nasopharyngeal samples ($n = 4232$) obtained from children aged 0–6 years attending day care centers were studied. PCV-13 immunization rates were very high in both regions ($> 75\%$). Pneumococcal carriage remained consistently high: 62.1, 62.4, and 61.6% during the study periods, respectively ($p = 0.909$) in the urban region and 59.8, 62.8, 59.5% ($p = 0.543$) in the rural region. Meanwhile, the carriage of serotypes comprising PCV-13 decreased in both urban (16.4, 7.3, and 1.6%; $p < 0.001$) and rural areas (13.2, 7.8, and 1.9%; $p < 0.001$). This decrease was mainly due to serotype 19A (14.1, 4.4 and 1.3% in the urban region and 11.1, 3.6 and 0.8% in the rural region; $p < 0.001$), while serotypes 11D, 15A/B/C, 16F, 21, 22F, 23A/B, 24F, 35F and untyped variants were most prevalent in the late stages of PCV-13 immunization [16].

Monitoring of serotype composition of circulating pneumococci allowed in our study to identify some trends in the structure of dominant serotypes depending on the vaccine status of children. Thus, we found that, despite the predominance of vaccine serotypes, the proportion of *S. pneumoniae* variants included in PCV-13 tends to decrease and to be replaced by serotypes not included in its composition. We observed serotype replacement processes in both groups, but with different intensity. The groups of vaccinated children showed greater genetic diversity with predominance of non-vaccine serotypes (15AF — 17.4%; 23A — 19.2%), while in the group of unvaccinated children their share was lower (15AF — 10%; 23A — 11%).

The replacement of vaccine serotypes with non-vaccine serotypes was reported by researchers

soon after the introduction of mass immunization with PCV in various countries. Following the introduction of routine immunization with PCV-7 in the USA in 2003–2005, profound changes in the distribution of serotypes colonizing the nasopharynx of children were reported, with some of the non-vaccine serotypes becoming more prevalent and more aggressive due to antibiotic resistance [17, 18].

Since the introduction of PCV-13, researchers from countries that have included this vaccine in their national immunization programs have reported an increase in the number of infections with *S. pneumoniae* serogroup 15, which is not covered by this vaccine [19–21]. Pneumococci of this serogroup have caused outbreaks and deaths in children [22, 23].

In China, continuous monitoring at the Beijing Children's Hospital, partially reflecting the prevalence of *S. pneumoniae* in Chinese children during the study period, has shown the share of serogroup 15 pneumococci in the pediatric population to be as high as 6.12%. After the introduction of PCV-13 in China in May 2017, the isolation rates of *S. pneumoniae* serogroup 15 in 2018 and 2019 were 7.41% and 10.53%, respectively, showing an upward trend [24]. Chinese researchers found that *S. pneumoniae* serogroup 15 strains exhibited good sensitivity to common antibiotics, but the most common clonal complex (CC) CC3397 was 100% resistant to penicillin, suggesting the influence of antibiotics in altering the predominant CCs [24]. Many studies have previously reported clonal shift phenomena in other serotypes, for example, CC271 replaced CC983 among serotype 19F strains [25], ST81 replaced ST342 among pneumococcal isolates of serotype 23F [26], CC320 replaced CC230 in 19A strains [27], CC876 replaced CC875 in serotype 14 strains [28]. These examples of clonal shift phenomena in one serotype may be caused by the selection effect of antibiotics, according to which sequence types expressing high antibiotic resistance replace sequence types with lower resistance. Long-term epidemiologic studies of antibiotic resistance of *S. pneumoniae* strains among different serotypes, including serogroup 15, are necessary to confirm this theory.

Over the period of our observations since 2016, we also note an increasing trend in the prevalence of serogroup 15 serotypes: the proportion of 15AF sero-

types in 2016–2019 and 2020–2021 increased from 2.4% to 7.0%, with 17.4% in the group of vaccinated children in 2021; for the part of serogroup 15BC, there is also an increasing trend from 2.4% in 2016 to 3.9% in 2019 [29]. Serogroup 15B, 15A and 15C serogroup 15 are known to be among the most common serotypes of *S. pneumoniae* associated with invasive pneumococcal disease after the introduction of PCV-13, furthermore, 15B contributes significantly to the development of acute otitis media. The capsular polysaccharides of serotypes 15A, 15B, and 15C are closely related, with 15A having a linear structure of repeating units, and 15B and 15C having a branched structure of repeating units of carbohydrate residues [30].

According to the results of the Russian multicenter PeGAS studies 2015–2018 on invasive strains of *S. pneumoniae*, the dominant serotypes belonging to serogroups 3 (21%), 19F and 6ABE (11% each), 15B (6.5%) were identified. Sequence types were determined in all 46 strains studied and 6 previously undescribed sequence types were identified: ST15247–ST15252, while MLST did not reveal a predominant sequencing type or identify a CC, with the exception of serotype 3 strains [31]. According to the results of another multicenter study from 2016, the genetic lines CC505 (serotype 3), CC236/CC271/CC320 (19F),

CC1025 (15BC), CC143 (different serotypes), CC311 (23F), which are often associated with invasive diseases, are predominantly widespread in Russia. For CC1025, which includes serotype 15BC, an increasing trend in abundance has also been noted. The genetic lines CC505, CC1025 and CC311 are associated with sensitivity to most classes of antibiotics. The genomes of representatives of the widespread genetic lines carry a variety of virulence determinants [32].

Conclusion

The studies indicate a high frequency of nasopharyngeal colonization in preschoolers, especially among urban children. At the same time, the serotype landscape is influenced by the vaccination status of the children: reliable differences in the frequency of occurrence of different serotypes in vaccinated and unvaccinated children have been established. At the present stage, monitoring only the serotype (serogroup) composition of circulating *S. pneumoniae* strains is insufficient. In order to improve epidemiologic surveillance of pneumococcal infection, it is necessary to introduce the monitoring of circulating *S. pneumoniae* CC and analysis of genetic determinants of antibiotic resistance depending on ST, using WGS and bioinformatics analysis.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году». М.; 2023. State Report «About the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2022». Moscow; 2023.
2. Ganaie F., Saad J. S., McGee L., et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral streptococcus. *mBio*. 2020;11(3):e00937-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00937-20>
3. WHO. Pneumococcal conjugate vaccines in infants and children under 5 years of age. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2019;94(8):85–104.
4. Ubukata K., Takata M., Morozumi M., et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine on genotypic penicillin resistance and serotype changes, Japan, 2010–2017. *Emerg. Infect. Dis*. 2018;24(11):2010–20. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2411.180326>
5. Kim S.H., Chung D.R., Song J.H., et al. Changes in serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients in Asia: emergence of drug-resistant non-vaccine serotypes. *Vaccine*. 2020;38(38):6065–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.065>
6. Hurley D., Griffin C., Young M., et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV20) in adults 60 to 64 years of age. *J. Clin. Infect. Dis*. 2021;73(7):e1489–97. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1045>
7. Pribelski A., Antipov D., Meleshko D., et al. Using SPAdes de novo assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2020;70(1):e102. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
8. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol*. 2017;13(6):e1005595. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
9. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072–5. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
10. Larsen M.V., Cosentino S., Rasmussen S., et al. Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol*. 2012;50(4):1355–61. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
11. 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>
12. 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>
13. 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>
14. Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P., et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic. Acids. Res*. 2017;45(W1):W30–5. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
15. Sidorenko S., Rennert W., Lobzin Y., et al. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. *Microbiol. Infect. Dis*. 2020;96(1):114914. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114914>
16. Felix S., Handem S., Nunes S., et al. Impact of private use of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) on pneumococcal carriage among Portuguese children living in urban and rural regions. *Vaccine* 2021;39(32):4524–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.06.035>
17. Hicks L.A., Harrison L.H., Flannery B., et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *J. Infect. Dis*. 2007;196(9):1346–54. DOI: <https://doi.org/10.1086/521626>
18. Pai R., Moore M.R., Pilishvili T., et al. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J. Infect. Dis*. 2005;192(11):1988–95. DOI: <https://doi.org/10.1086/498043>
19. van der Linden M., Perniciaro S., Imöhl M. Increase of serotypes 15A and 23B in IPD in Germany in the PCV13 vaccination era. *BMC Infect. Dis*. 2015;15:207. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0941-9>
20. Sheppard C., Fry N. K., Mushtaq S., et al. Rise of multidrug-resistant non-vaccine serotype 15A *Streptococcus pneumoniae* in the United Kingdom, 2001 to 2014. *Euro. Surveill*. 2016;21(50):30423. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30423>
21. Nakano S., Fujisawa T., Ito Y., et al. Spread of meropenem-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 15A-ST63 clone in Japan, 2012–2014. *Emerg. Infect. Dis*. 2018;24(2):275–83. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2402.171268>
22. Fleming-Dutra K., Mbaeyi C., Link-Gelles R., et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 15A in psychiatric unit, Rhode Island, USA, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis*. 2012;18(11):1889–93. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1811.120454>
23. Arushothy R., Ramasamy H., Hashim R., et al. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* causing invasive pneumococcal disease isolated from a paediatric patient. *Int. J. Infect. Dis*. 2020;90:219–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.037>
24. Shi W., Du Q., Yuan L., et al. Antibiotic resistance and molecular biological characteristics of non-13-valent-pneumococcal conjugate vaccine serogroup 15 *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in China. *Front. Microbiol*. 2022;12:778985. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.778985>
25. Li Q.H., Yao K.H., Yu S.J., et al. Spread of multidrug-resistant clonal complex 271 of serotype 19F *Streptococcus pneumoniae* in Beijing, China: characterization of serotype 19F. *Epidemiol. Infect*. 2013;141(12):2492–6. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268813000514>
26. Ma X., Yao K.H., Yu S.J., et al. Genotype replacement within serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* in Beijing, China: characterization of serotype 23F. *Epidemiol. Infect*. 2013;141(8):1690–6. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268812002269>
27. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Пономаренко О.А. и др. Динамика распространенности серотипов и антибиотикорезистентности носоглоточных пневмококков, выделенных у детей в 2010–2016 гг.: результаты ретроспективного когортного исследования. *Вопросы современной педиатрии*. 2017;16(5):413–23. Mayanskiy N.A., Alyab'eva N.M., Ponomarenko O.A., et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility of nasopharyngeal pneumococci isolated from children in 2010–2016: a retrospective cohort study. *Current Pediatrics*. 2017;16(5):413–23. DOI: <https://doi.org/10.15690/VSP.V16I5.1806>
EDN: <https://elibrary.ru/ztiyjkx>
28. He M., Yao K., Shi W., et al. Dynamics of serotype 14 *Streptococcus pneumoniae* population causing acute respiratory infections among children in China (1997–2012). *BMC Infect. Dis*. 2015;15:266. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1008-7>
29. Исаева Г.Ш., Баязитова Л.Т., Зарипова А.З. и др. Региональные особенности серотипового состава *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от детей-бактерионосителей дошкольного возраста в Республике Татарстан. *Эпиде-*

- миология и вакцинопрофилактика. 2023;22(3):26–35. Isaeva G.Sh., Bayazitova L.T., Zaripova A.Z., et al. Regional features of the serotype composition of *Streptococcus pneumoniae* isolated from bacterial carriers of preschool age in the Republic of Tatarstan. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2023;22(3):26–35.
DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-3-26-35>
EDN: <https://elibrary.ru/avelpt>
30. Hao L., Kuttel M.M., Ravenscroft N., et al. *Streptococcus pneumoniae* serotype 15B polysaccharide conjugate elicits a cross-functional immune response against serotype 15C but not 15A. *Vaccine*. 2022;40(33):4872–80.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.041>
31. Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В. и др. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(2):113–8. Mironov K.O., Korchagin V.I., Михайлова Ю.В., et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(2):113–8.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>
EDN: <https://elibrary.ru/lxmqy>
32. Цветкова И.А., Никитина Е.В., Александрова Е.В. и др. Характеристика распространенных генетических линий *Streptococcus pneumoniae*, циркулировавших в различных регионах России с 2003 г. по 2022 г. *Проблемы медицинской микологии*. 2023;25(2):195. Tsvetkova I.A., Nikitina E.V., Aleksandrova E.V., et al. Wide-spread *Streptococcus pneumoniae* genetic lines in different regions of Russia, 2003–2022. *Problems in Medical Mycology*. 2023;25(2):195.
EDN: <https://elibrary.ru/rrsufj>

Information about the authors

Guzel Sh. Isaeva[✉] — D. Sci. (Med.), Deputy Director, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia; Head, Department of microbiology named after Academician V.M. Aristovsky, Kazan State Medical University, Kazan, Russia, guisaeva@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1462-8734>

Albina Z. Zaripova — assistant, Department of microbiology named after Academician V.M. Aristovsky, Kazan State Medical University, Kazan, Russia; Head, Personnel department, Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan (Tatarstan), Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6790-0538>

Lira T. Bayazitova — Cand. Sci. (Med.), Head, Research laboratory of microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia; Associate Professor, Department of microbiology named after Academician V.M. Aristovsky, Kazan State Medical University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2142-7682>

Ralina M. Khusainova — assistant, junior researcher, Research laboratory of microbiology, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia; Department of microbiology named after Academician V.M. Aristovsky, Kazan State Medical University, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4733-3959>

Tatiana A. Chazova — junior researcher, Microbiology laboratory, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2013-4239>

Olga F. Tyupkina — senior researcher, Microbiology laboratory, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8180-1165>

Ekaterina V. Nikitina — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of medical microbiology and molecular epidemiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9737-9496>

Irina A. Tsvetkova — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Department of medical microbiology and molecular epidemiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia; assistant, Department of microbiology, virology and immunology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0170-6975>

Author contribution: *Isaeva G.Sh.* — concept and design of research, organization of collection and processing of material, writing text; *Zaripova A.Z.* — processing of material, statistical processing of material; *Bayazitova L.T.* — organization of collection and processing of material; *Khusainova R.M.*, *Chazova T.A.*, *Tyupkina O.F.* — collection and processing of material; *Nikitina E.V.* — collection and processing of material, editing; *Tsvetkova I.A.* — collection and processing of material, 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 15.12.2023;
accepted for publication 02.02.2024;
published 28.02.2024

Информация об авторах

Исаева Гузель Шавхатовна[✉] — д.м.н., зам. директора Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия, зав. каф. микробиологии им. акад. В.М. Аристовского Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия; guisaeva@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1462-8734>

Зарипова Альбина Зуфаровна — ассистент каф. микробиологии им. акад. В.М. Аристовского Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия; начальник отдела кадров Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан), Казань, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6790-0538>

Баязитова Лира Табрисовна — к.м.н., зав. научно-исследовательской лабораторией микробиологии Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия, доцент каф. микробиологии им. акад. В.М. Аристовского Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2142-7682>

Хусаинова Ралина Маратовна — м.н.с. научно-исследовательской лаборатории микробиологии Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия, ассистент каф. микробиологии им. акад. В.М. Аристовского Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4733-3959>

Чазова Татьяна Александровна — м.н.с. лаб. микробиологии Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2013-4239>

Тюпкина Ольга Феликсовна — с.н.с. лаб. микробиологии Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8180-1165>

Никитина Екатерина Валерьевна — к.б.н., н.с. научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9737-9496>

Цветкова Ирина Анатольевна — к.б.н., м.н.с. научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия; ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0170-6975>

Участие авторов: *Исаева Г.Ш.* — концепция и дизайн исследования, организация сбора и обработки материала, написание текста; *Зарипова А.З.* — обработка материала, статистическая обработка материала; *Баязитова Л.Т.* — организация сбора и обработки материала; *Хусаинова Р.М.*, *Чазова Т.А.*, *Тюпкина О.Ф.* — сбор и обработка материала; *Никитина Е.В.* — сбор и обработка материала, редактирование; *Цветкова И.А.* — сбор и обработка материала, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 15.12.2023;
принята к публикации 02.02.2024;
опубликована 28.02.2024

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-442>

Phylogenetic position and genetic features of HIV-1 in CNS

Mikhail V. Pterskiy^{1✉}, Oleg A. Khodakov¹, Tatyana V. Mikheeva², Natalia V. Bilalova¹, Alena B. Konkova-Reidman², Yuliya A. Zakharova³, Aleksandr V. Semenov¹

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

²South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

³F.F. Erisman Federal Scientific Centre of Hygiene, Moscow, Russia

Abstract

Background. Due to the wide coverage with antiretroviral therapy, the life expectancy of HIV infected people has significantly increased. Against the background of a decrease in mortality from HIV infection, HIV-associated neurocognitive disorders, which develop even during effective treatment, are of high importance. The overall prevalence of this pathology among HIV-infected people reaches 42.6%.

The objective of the study was to research the genetic features and phylogenetic position of HIV-1 persisting in the central nervous system.

Materials and methods. The clinical study group consisted of 38 patients with severe neurocognitive disorders against the background of HIV infection in stage 4B. The viral load of HIV-1 in blood plasma and cerebrospinal fluid (CSF) was measured using the "AmpliSens HIV Monitor-FRT" reagents kit. Sanger sequencing was performed using the AmpliSens HIV-Resist-Seq assay kit on an Applied Biosystems 3500 analyzer. Phylogenetic analysis of the *pol* gene fragments of HIV-1 strains (the site encoding the viral protease and part of the reverse transcriptase) was carried out using maximum likelihood method with the GTR+G nucleotide substitution model. Comparisons of the tertiary structure of viral proteins were performed according to three-dimensional models of the protease and p51 and p66 reverse transcriptase subunits obtained by homologous reconstruction using the SWISS-MODEL tools.

Results. The viral load in the sample of patients with severe CNS lesions in blood plasma was 6.27 times higher than in CSF and amounted to 4.67 and 3.87 lg copies/ml respectively by median ($p = 0,004$).

Phylogenetic analysis with the use of all available HIV-1 genomes from GenBank, which differed from the studied ones by less than 5% showed close genetic relations of viruses circulating in Chelyabinsk region, apart from strains circulating in Russian Federation, with viruses circulating in neighboring countries, in most abundance — from Ukraine and Kyrgyzstan, slightly less — from Belarus, Tajikistan, Kazakhstan and Armenia and also with strains from certain foreign countries: Poland and Germany. Phylogenetic analysis of 38 HIV-1 genomes revealed significant genetic distances between HIV isolates from blood plasma and CSF in 5 patients, 4 of whom were PWID, which may indicate an event of superinfection.

The amount of independent amino acid substitutions in protease in isolates from blood plasma ranged from 1 to 3, in isolates from CSF — from 1 to 2. An amount of such substitutions in a fragment of reverse transcriptase in isolates from blood plasma ranged from 1 to 6, while in isolates from CSF, it ranged from 1 to 7. HIV isolates from blood plasma and CSF from 5 patients had differences in the tertiary structure of HIV-1 reverse transcriptase p51 subunit in amino acid positions 16–20 and 210–235. Isolates from 3 other patients differed in the tertiary structure only in amino acid positions 210–235. Isolates from 3 patients differed in the structure of HIV-1 RT p66 subunit in a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket (NNRTI) region. Fixed differences in the tertiary structure of p51 subunit required at minimum only 1 amino acid substitution to emerge. Alterations in the tertiary structure of p66 subunit required at least 3 amino acid substitutions.

Conclusion. Microevolution of HIV-1 proceeds in parallel within the same patient, in different compartments, which is reflected in the accumulation of amino acid substitutions different from another compartment in the conserved *pol* gene. There is a weak correlation between the viral load level in plasma and in CSF. The genetic heterogeneity of HIV strains from patients of the Chelyabinsk region indicates a high frequency of reintroduction of HIV infection in the region from other countries. Differences in the tertiary structure of HIV-1 reverse transcriptase between blood plasma and CSF isolates are regularly fixed in certain domains, which also confirms the presence of parallel HIV microevolution during virus persistence in tissues separated by the blood-brain barrier which allows a better understanding of the fixation trends of individual amino acid substitutions during HIV-induced damage to central nervous system.

Keywords: HIV, HIV infection, neurocognitive disorders, brain lesions, subtypes, protease, reverse transcriptase, tertiary structure of enzymes

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study was approved by the local Ethics Committee of the Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" (protocol No. 2, May 26, 2022) and by the local Ethics Committee of the Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections (protocol No. 3, June 17, 2016).

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the staff of the Ural District Center for AIDS Prevention and Control: to the doctors of clinical laboratory diagnostics N.E. Chetverkina and A.A. Klimova, epidemiologist O.Ya. Yarantseva, who assisted in conducting this study.

Source of funding. Financing of the study was carried out at the expense of a subsidy for the implementation of research work (reg. number in the Unified State information system for accounting of research, development and technological works for civil purposes 121041500042-8) p.1.2.1 of the Rospotrebnadzor sectorial program for 2021–2025 "Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases".

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

For citation: Piterskiy M.V., Khodakov O.A., Mikheeva T.V., Bilalova N.V., Konkova-Reidman A.B., Zakharova Yu.A., Semenov A.V. Phylogenetic position and genetic features of HIV-1 in CNS. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):100–113.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-442>

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

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-442>

Филогенетическое положение и генетические особенности вируса иммунодефицита человека-1 в центральной нервной системе

Питерский М.В.^{1✉}, Ходаков О.А.¹, Михеева Т.В.², Билалова Н.В.¹,
Конькова-Рейдман А.Б.², Захарова Ю.А.³, Семенов А.В.¹

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

²Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

³Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Благодаря широкому охвату пациентов с ВИЧ-инфекцией антиретровирусной терапией существенно увеличилась продолжительность жизни инфицированных людей. На фоне снижения смертности от ВИЧ-инфекции высокую важность приобретают ВИЧ-ассоциированные нейрокогнитивные расстройства, которые развиваются даже на фоне эффективного лечения. Общая распространённость такой патологии среди лиц, живущих с ВИЧ, достигает 42,6%.

Целью исследования явилось изучение генетических особенностей и филогенетического положения ВИЧ-1, персистирующего в центральной нервной системе (ЦНС).

Материалы и методы. Обследованы 38 пациентов с тяжёлыми нейрокогнитивными нарушениями на фоне ВИЧ-инфекции в стадии 4В. Вирусную нагрузку ВИЧ-1 определяли в пробах плазмы крови и ликвора с использованием реагентов «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT», выполняли секвенирование по Сэнгеру. Филогенетический анализ фрагментов гена *pol* штаммов ВИЧ-1 (участок, кодирующий вирусную протеазу и часть обратной транскриптазы) проводили методом максимального правдоподобия с моделью замены нуклеотидов GTR+G. Сравнения третичной структуры вирусных белков выполняли на основе трёхмерных моделей протеазы и субъединиц p51 и p66 обратной транскриптазы, полученных методом гомологического построения с использованием сервиса SWISS-MODEL.

Результаты. Уровень вирусной нагрузки в выборке пациентов с тяжёлыми поражениями ЦНС в плазме крови был в 6,27 раза выше, чем в ликворе, и составлял по медиане 4,67 и 3,87 lg копий/мл соответственно ($p = 0,004$). Филогенетический анализ с использованием всех доступных в GenBank геномов ВИЧ, отличающихся менее чем на 5% от исследуемых штаммов, показал близкое генетическое родство вирусов, циркулирующих в Челябинской области, помимо штаммов из России, со штаммами ВИЧ, циркулирующими в странах ближнего зарубежья, в первую очередь на Украине и в Киргизии, несколько меньше — в Белоруссии, Таджикистане, Казахстане, Армении, а также со штаммами из Польши и Германии. Филогенетический анализ 38 геномов ВИЧ из парных проб (ликвор и плазма крови) позволил выявить у 5 пациентов, 4 из которых являлись потребителями инъекционных наркотиков, существенные генетические дистанции между штаммами ВИЧ, выделенными из ликвора и из плазмы крови, что может свидетельствовать о суперинфицировании разными штаммами.

Количество независимых аминокислотных замен в протеазе у штаммов из плазмы составляло от 1 до 3, у штаммов из ликвора — от 1 до 2, в фрагменте обратной транскриптазы в штаммах из плазмы крови — от 1 до 6, в штаммах из ликвора — от 1 до 7. В штаммах ВИЧ из плазмы и ликвора от 5 пациентов была

выявлена разница в структуре субъединицы р51 обратной транскриптазы в аминокислотных позициях 16–20 и 210–235, ещё от 3 пациентов — только в позициях 210–235. В штаммах ВИЧ из плазмы и ликвора от 3 пациентов наблюдалась разница в структуре субъединицы р66 обратной транскриптазы в области связывания с нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы. Для появления закрепляющихся различий в третичной структуре субъединицы р51 оказалось достаточно изменения всего 1 аминокислоты. Для изменения третичной структуры субъединицы р66 минимальное количество аминокислотных замен составляло 3.

Заключение. Микроэволюция ВИЧ-1 идёт параллельно в пределах одного пациента в разных компартментах, что отражается в накоплении отличных от другого компартмента аминокислотных замен в консервативном гене *pol*. Имеется слабая корреляция между уровнем вирусной нагрузки в плазме и в ликворе. Генетическая гетерогенность штаммов ВИЧ от пациентов из Челябинской области свидетельствует о высокой частоте заносов ВИЧ-инфекции в регион из других государств. Различия в третичной структуре обратной транскриптазы ВИЧ-1 между штаммами из плазмы крови и из ликвора закономерно закрепляются в определённых участках, что также подтверждает наличие параллельной микроэволюции ВИЧ в ходе персистенции вируса в тканях, разделённых гематоэнцефалическим барьером, что позволяет лучше понять тенденции закрепления отдельных аминокислотных замен при поражении ЦНС ВИЧ.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, ВИЧ-инфекция, нейрокогнитивные расстройства, поражения головного мозга, субтипы, протеаза, обратная транскриптаза, третичная структура ферментов

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФНИИВИ «Виром» (протокол № 2 от 26.05.2022) и локальным этическим комитетом Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (протокол № 3 от 17.06.2016).

Благодарность. Авторы выражают признательность сотрудникам Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФНИИВИ «Виром» — врачам клинической лабораторной диагностики Н.Е. Четверкиной и А.А. Климовой, врачу-эпидемиологу О.Я. Яранцевой, оказавшим помощь в проведении данного исследования.

Источник финансирования. Финансирование исследования осуществлялось за счёт субсидии на выполнение НИР (рег. номер в ЕГИСУ НИОКТР 121041500042-8) п.1.2.1 отраслевой программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

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

Для цитирования: Питерский М.В., Ходаков О.А., Михеева Т.В., Биалова Н.В., Конькова-Рейдман А.Б., Захарова Ю.А., Семенов А.В. Филогенетическое положение и генетические особенности вируса иммунодефицита человека-1 в центральной нервной системе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):100–113.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-442>

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

Introduction

HIV-associated neurocognitive disorders are common among people living with HIV/AIDS despite effective antiretroviral therapy (ART). Even when the virus replication is effectively suppressed in the bloodstream, it may still be observed in the cerebrospinal fluid (CSF) of certain patients. This is because the permeability of the blood-brain barrier (BBB) to different antiretroviral drugs varies considerably, and the concentration of certain drugs in the CSF does not reach the concentrations necessary to effectively suppress HIV replication [1, 2]. Detection of HIV infection at late stages results in patients who already have clinical symptoms of central nervous system (CNS) lesions due to the damage caused by HIV replication in the CNS prior to starting ART [3–5].

It is known that HIV, in addition to affecting cells of the immune system, can penetrate into the CNS, which leads to various complications, including HIV-associated neurocognitive disorder (HAND).

It is divided into three stages according to the severity of symptoms:

- asymptomatic neurocognitive disorder;
- mild neurocognitive disorder;
- HIV-associated dementia [6].

The 2020 Global Meta Study found that the overall prevalence of HAND worldwide is 42.6% and varies by region. South Africa has the highest prevalence of HAND (as well as the highest number of HIV-positive individuals) and accounts for about 72% of all cases globally. About 88% of all HAND cases are usually in milder forms (asymptomatic or mild neurocognitive disorder), while HIV-associated dementia is quite rare [7, 8].

HIV penetration into the CNS occurs approximately 4–8th day after infection, when a person is usually not yet diagnosed with HIV infection [9]. The virus passes through the BBB with the help of infected monocytes and T lymphocytes [10], [11]. HIV provirus-containing CD14⁺ and CD16⁺ monocytes have been observed to pass through the BBB more actively than similar uninfected cells. The adhesive molecules JAM-A (junctional adhesion molecule A, or CD321) and ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule, or CD166)

play an important role in this process. By interacting with microvascular endothelial cells of the BBB, they allow monocytes to penetrate the barrier. Their expression is significantly increased in infected CD14⁺ and CD16⁺ monocytes. Furthermore, the number of chemokines in the CNS, in particular CCL2, increases, and the number of receptors to this chemokine increases on the surface of infected CD14⁺- and CD16⁺-monocytes [12, 13].

Upon entry into the CNS, infected monocytes may differentiate into perivascular macrophages, which will form a stable reservoir for the virus and will release viral particles for an extended period of time, infecting other CNS cells, such as macrophages, astrocytes and microglia, each of which may also act as a reservoir for the virus, even under conditions of prolonged administration of antiretroviral drugs [14]. HIV-infected cells in the nervous system produce viral proteins such as Tat and Nef, resulting in chronic low-level inflammation. And this inflammation persists even when antiretroviral drugs are administered [15, 16]. The first known longitudinal study of patients with HIV aged 50 years and older found that taking ART and regular check-ups cannot prevent the development of HAND [17].

A number of studies have found that the evolution of HIV-1 into the CNS parallels the evolution of the virus remaining outside the CNS [18–20]. For example, the *env* gene proteins of strains from CSF acquire specific forms that interact with CD4 and the N-terminus of CCR5 in tandem, allowing more efficient virus entry into macrophages located in the CNS that express low amounts of CD4 [21]. Genetic differences between HIV-1 populations isolated from plasma and CSF are present in other genes such as *tat*, *nef*, and *pol* [22–24]. Mutations associated with drug resistance can occur in both plasma and CSF strains, and in certain cases drug resistance mutations may be present in CSF strains and absent in plasma strains of patients [25].

The replication-capable HIV reservoir represents a genetically restricted and generally "younger" subset of the overall pool [26]. The stability of the HIV genome is closely related to the structural features of HIV reverse transcriptase, which, by making errors in HIV DNA synthesis, is the cause of mutations [27].

HIV-1 reverse transcriptase is an asymmetric heterodimer consisting of p51 (440 amino acids long) and p66 (560 amino acids long) subunits. Each subunit contains subdomains such as fingers (amino acids 1–85, 118–155), palm (amino acids 86–117, 156–236), thumb (amino acids 237–318), and a connecting subdomain (amino acids 319–446). The p66 subunit also includes a subdomain connecting it to RNase H (amino acids 427–560). The catalytically active center is formed by amino acids 110, 185, and 186. These two subunits have different spatial organization, and only the p66 subunit is catalytically active, while p51 plays only a structural role [28].

The study of differences in the three-dimensional structure of protease and reverse transcriptase of HIV strains separated by the BBB is of interest to reveal the direction of adaptive changes of the virus associated with the presence in a certain compartment.

Materials and methods

Between January 2018 and March 2022, 38 HIV-infected patients from the Chelyabinsk region with neurocognitive disorders and severe immunodeficiency were examined.

The patients' age averaged 39 years (mean square deviation $\sigma = 7$, Shapiro–Wilk coefficient $W = 0.917$ at $p = 0.008$). Among the subjects, 20 were men (52.63%; 95% confidence interval (CI) 37.3–67.5) and 18 were women (47.37%, 95% CI 32.5–62.7). All patients were in stage 4B HIV infection. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study was approved by the local Ethics Committee of the Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" (protocol No. 2, May 26, 2022) and by the local Ethics Committee of the Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections (protocol No. 3, June 17, 2016).

CD4-cell counts were measured using a BD FACSCanto II flow cytometer and BD Tritest CD4/CD8/CD3 reagent kit (Becton Dickinson). Viral load level was determined using the AmpliSense HIV-Monitor-FRT reagent kit (CRIE Rospotrebnadzor), sequencing — using the AmpliSense HIV-Resist-Seq reagent kit (CRIE Rospotrebnadzor). Electrophoregrams were processed and consensus sequences were obtained using Deona 1.7.0 software (RMBit Company).

A total of 57 nucleotide sequences of the *pol* HIV-1 gene were obtained, including paired samples from blood plasma and CSF from 19 patients, HIV RNA in sufficient quantity for sequencing was isolated either from blood plasma or CSF of 19 other patients. All nucleotide sequences have been deposited in the international GenBank database (Accession numbers: OR260480-OR260536).

With respect to the nucleotide sequences under study, we searched for the closest related HIV genomes using the NCBI BLAST service [29]. A data set comprising HIV genomes with 95% or higher sequence similarity to the original sequences was formed ($n = 2929$). Multiple alignment was performed using the ClustalOmega algorithm on the EMBL online service [30]. Subtyping, detection of drug resistance mutations and other mutations were performed using the Stanford University HIV drug resistance database (HIVdb Program: Mutations Analysis, program version 3.4.3; algorithm version 9.4) [31].

For phylogenetic analysis, the selection of the most appropriate nucleotide substitution model for the available data was performed using the FindModel online service [32]. Phylogenetic trees were construc-

ted using the maximum likelihood method with the GTR+G (General Time Reversible + gamma) nucleotide substitution model using the "MEGA X" software [33]. 500 bootstrap replications were used as a measure of statistical support.

For phylogenetic analysis of paired genome samples of HIV strains isolated from blood plasma and CSF of 19 patients, HIV genomes representing different subtypes were added as a reference sequences: A6 (EU861977, KU749403, KT983615, JX500694), B (JX500708) and CRF63_02A6 (JN230353). The above strains are the reference strains for subtypes and circulating recombinant HIV strains according to Los Alamos HIV databases [34].

Statistical processing of data was carried out using the Statistica v. 12 software product (StatSoft Russia). Confidence intervals were calculated using Wilson's method for the level of type 1 error 0.05 [35]. Nonparametric statistics criteria (χ^2 , Fisher's exact test, Mann-Whitney test) were used to confirm statistically significant difference.

Three-dimensional models of viral proteins (protease and reverse transcriptase) were obtained by homology construction method. For the protease, the crystal structure model of HIV-1 protease, subtype A (PDB ID: 3ix0) was used. This model was chosen because it had the highest similarity to our amino acid sequences among HIV-1 protease models that were not associated with inhibitors and did not have drug resistance mutations, and it also belonged to the closest subtype A.

For reverse transcriptase, the p51 subunit model of HIV-1 reverse transcriptase (PDB ID: 3kqv) and the HIV-1 reverse transcriptase/RNase H model (PDB ID: 4icl) were used. These models have the highest primary structure similarity to our sequences among models that are not in complex with inhibitors and have no drug resistance mutations.

Three-dimensional protein models were built and their structures were compared using the SWISS-MODEL online service [36, 37].

Results and discussion

Based on patient history, the duration of HIV infection from diagnosis to hospitalization was found to be 81 months on average ($\sigma = 64$; $W = 0.924$; $p = 0.01$). The majority of patients, 30 of 38 (79.0%; 95% CI 63.7–88.9), had no history of ART, and the remainder were on therapy for a median of up to 29 months (interquartile range (IQR) 9–35 months), but with low adherence, self-interrupting prescribed courses of treatment. Given that all patients were hospitalized at stage 4B of HIV, their infection occurred long before diagnosis. Thus, it was the long-term course of HIV infection without ART that caused CNS damage.

Among the patients studied ($n = 38$), the most common brain lesions were meningoencephalitis and encephalitis associated with opportunistic infections

and tuberculosis, 20 out of 38 cases (52.6%; 95% CI 37.3–67.5), among which encephalitis of toxoplasma etiology predominated, 10 out of 20 cases (50.0%; 95% CI 29.9–70.1). HIV encephalitis was identified in 18 of 38 cases (47.4%; 95% CI 32.5–62.7; **Figure 1**).

In this study, the groups of patients with brain lesions caused by opportunistic infections and the group of patients with HIV encephalitis had no statistically significant differences in terms of ART experience, sex, age and other indicators, which is possibly due to the small sample size. Previous studies have shown that the spectrum of neurological disorders in patients with HIV infection depends significantly on the availability of therapy and its timely initiation. In countries where ART is widely available, neurological symptoms in patients with HIV infection are often due to HIV encephalitis. On the other hand, in developing countries where access to HIV treatment still needs to be improved, neurological deterioration is often associated with opportunistic CNS infections such as toxoplasmosis and cryptococcosis [38].

Low CD4 count and high viral load are key factors determining the development of HIV encephalitis [39]. The level of HIV viral load in plasma was at a median of 4.67 (ICI 4.19–5.40) lg copies/mL and was statistically significantly higher than that in CSF, at a median of 3.87 (ICI 2.73–4.66) lg copies/mL, by 0.8 lg, or 6.27 times ($U = 442$; $z = 2.904$; $p = 0.004$).

The CD4-lymphocyte content in plasma was at a median of 41.0 (ICI 21.3–66.5) lg copies/mL, with no correlation with the level of viral load (**Fig. 2**).

The higher HIV viral load in CSF compared to plasma is quite common among patients not on effective ART and among ART-naïve patients, which was also shown in a cross-sectional multicenter study conducted in large European cities between 1982 and 2017 [40]. In this study, the difference in viral load level was 1.0 lg copies/mL, and there was a correlation between these values in plasma and CSF. In our study, there was a weak direct correlation between HIV viral load levels in plasma and CSF: Spearman coefficient $R_s = 0.38$, $p = 0.019$.

Among 57 genotyped samples from 38 patients, 54 representatives of subtype A6 were identified (94.7%; 95% CI 85.6–98.2), 2 samples from 1 patient contained recombinant strain CRF63_02A6 (3.5%; 95% CI 1.0–11.9) and 1 strain isolated from plasma contained subtype B (1.8%; 95% CI 0.3–9.3), whereas a strain isolated from the same patient's CSF belonged to HIV-1 subtype A6.

To determine the phylogenetic position of the studied strains, HIV genomes with 95% or higher similarity were found in each of the 57 sequences using the NCBI BLAST service. After excluding repetitive records, synthetic sequences, and records in which the country of origin of the strain could not be determined, 2872 nucleotide sequences remained, with a median

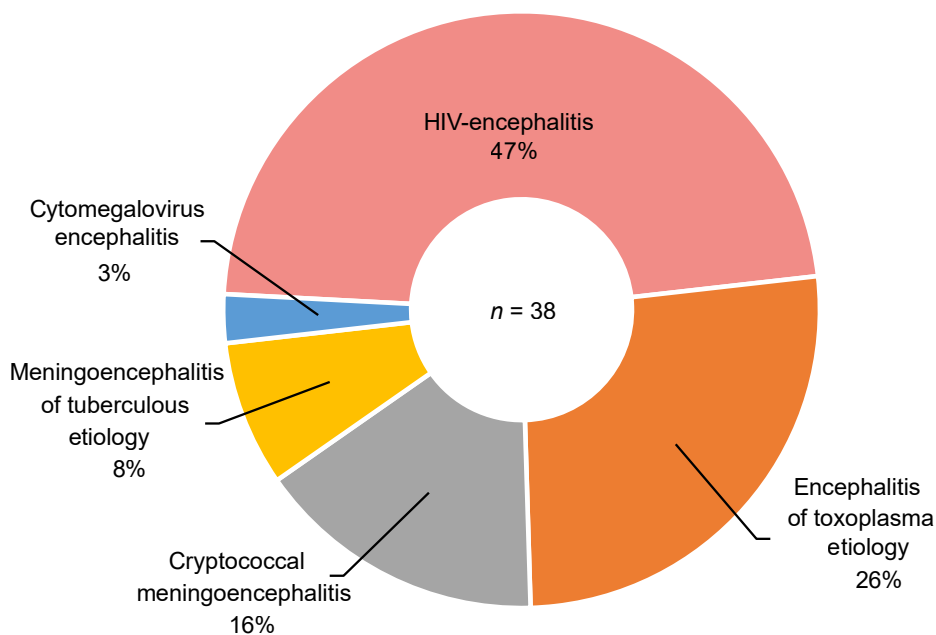


Fig. 1. Structure of brain lesions among the examined patients.

identity of 95.97% (ICI 95.52–96.51%). Together with the studied samples, the genotypic structure was represented by 2508 strains of subtype A6 (85.5%; 95% CI 84.1–86.7), 397 CRF63_02A6 (13.8%; 95% CI 12.6–15.1), 14 subtype B (0.5%; 95% CI 0.3–0.8), and 7 CRF02_A6G (0.2%; 95% CI 0.1–0.5) among the 2929 strains analyzed.

Phylogenetic analysis of 2929 HIV-1 pol gene fragments encoding a protease and part of a reverse transcriptase was performed by maximum likelihood analysis using the GTR+G nucleotide substitution model and 500 bootstrap replications. As a result, 26 clusters

were formed, 11 of which included 57 HIV strains isolated from the studied patients (**Fig. 3**).

Strains from patients in the study sample were included in 11 clusters. Among strains from patients from near abroad countries, strains circulating in Ukraine and Kyrgyzstan (6 out of 11 clusters each), Belarus, Tajikistan, Kazakhstan, Armenia (5 out of 11 clusters), and Poland and Germany (5 out of 11 clusters) were the most frequently found in clusters with the samples under study.

Among the 57 HIV strains isolated from patients in the study sample, 11 (19.3%; 95% CI 11.1–31.3)

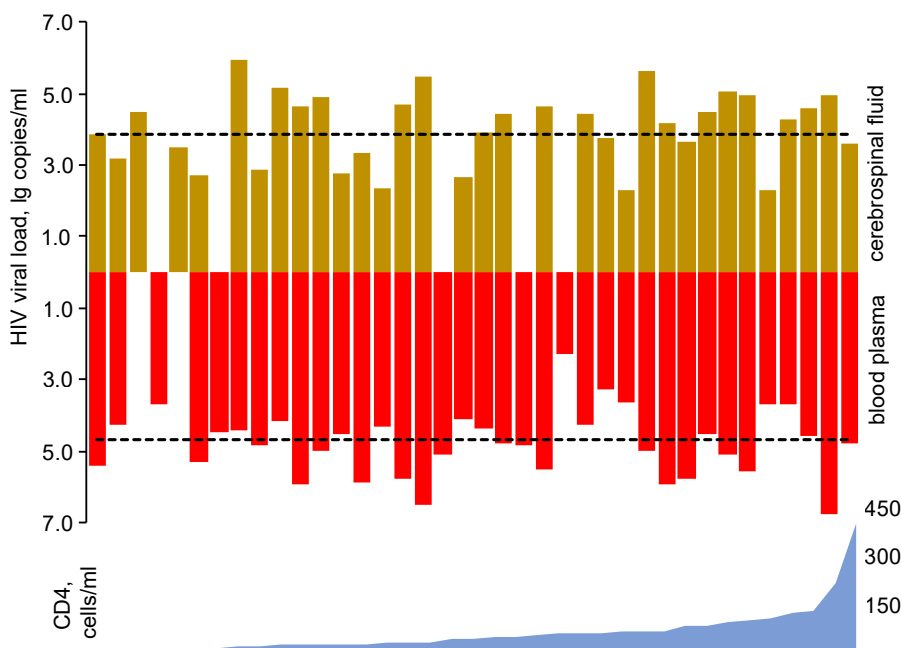


Fig. 2. HIV viral load in blood plasma and cerebrospinal fluid and an amount of CD4 cells among the examined patients ($n = 38$). The dotted line indicates the median.

formed a separate cluster #3, where they accounted for 73.3% (95% CI 48–89.1). These strains were isolated from 8 patients, including 6 women and 1 man from Chelyabinsk and 1 woman from the city of Satka, Chelyabinsk region. Of the 8 patients, only 2 were infected by intravenous drug use, and the rest were sexually infected.

Most related strains originated from Russia (75.4%; 95% CI 73.8–76.9). Their proportion varied from cluster to cluster from 24% (cluster #23) to 100% (cluster #15). Strains originating from foreign countries were of greatest interest.

The largest cluster on the phylogenetic tree, cluster #13, containing 873 HIV genomes (29.8%; 95% CI 28.2–31.5), contained 16 strains from patients in the study group, as well as strains from patients of 19 foreign countries. The highest proportions of the 208 HIV strains from foreign countries in this cluster were strains circulating in Kyrgyzstan (29.3%), Belarus (23.6%), and Tajikistan (12.0%).

Phylogenetic analysis of paired samples from blood plasma and CSF from 19 patients with references of subtype A6, subtype B and CRF63_02A6 showed that in 5 patients, sequences from plasma and CSF fell into different clusters and in one of them, HIV strains belonged to different subtypes: subtype B in plasma (ID159, AN: OR260493), and subtype A6 in CSF (ID160, AN: OR260494) (Fig. 4).

Of the 5 patients with genetic heterogeneity of HIV genomes from different compartments, 4 were people who inject drugs (PWID). It should be noted that minimal differences in the genome of HIV strains from CSF and plasma were observed in the patient who was not a PWID. On a phylogenetic tree with 2929 HIV genomes, strains from these patients also appeared in different clusters. Significant differences in the genome

of HIV persisting on different sides of the BBB may indirectly indicate superinfection of the patient, with a later-infected strain isolated from blood plasma.

To analyze amino acid substitutions and the tertiary structure of HIV protease and reverse transcriptase, strains were selected from paired samples from 13 patients out of 19. Five patients with high strain heterogeneity and suspected superinfection and one patient with identical amino acid composition of protease and reverse transcriptase in plasma and CSF strains were excluded from the comparison.

Comparative analysis of the detected amino acid substitutions in protease and reverse transcriptase of strains from plasma and CSF of 13 patients allowed us to identify independently arisen mutations that were formed and fixed in the process of microevolution of HIV strains separated by the BBB. Taking into account the extremely severe condition of the patients, in certain cases the maximum possible changes in the genome could be observed, which had time to occur during the course of HIV infection in one person without ART.

In the protease of HIV strains isolated from plasma, only 5 out of 13 samples showed amino acid substitutions that occurred independently (present only in strains from one compartment and, therefore, not inherited by a strain persisting in the CNS) from strains isolated from CSF, with the number of amino acid substitutions ranging from 1 to 3. In the strains isolated from CSF, independent amino acid substitutions were also observed in 5 of the 13 samples, and the number of amino acid substitutions ranged from 1 to 2.

In reverse transcriptase strains isolated from plasma, amino acid substitutions that occurred independently of strains isolated from CSF were detected in 10 of 13 samples, with the number of amino acid substitutions ranging from 1 to 6. In 12 samples from

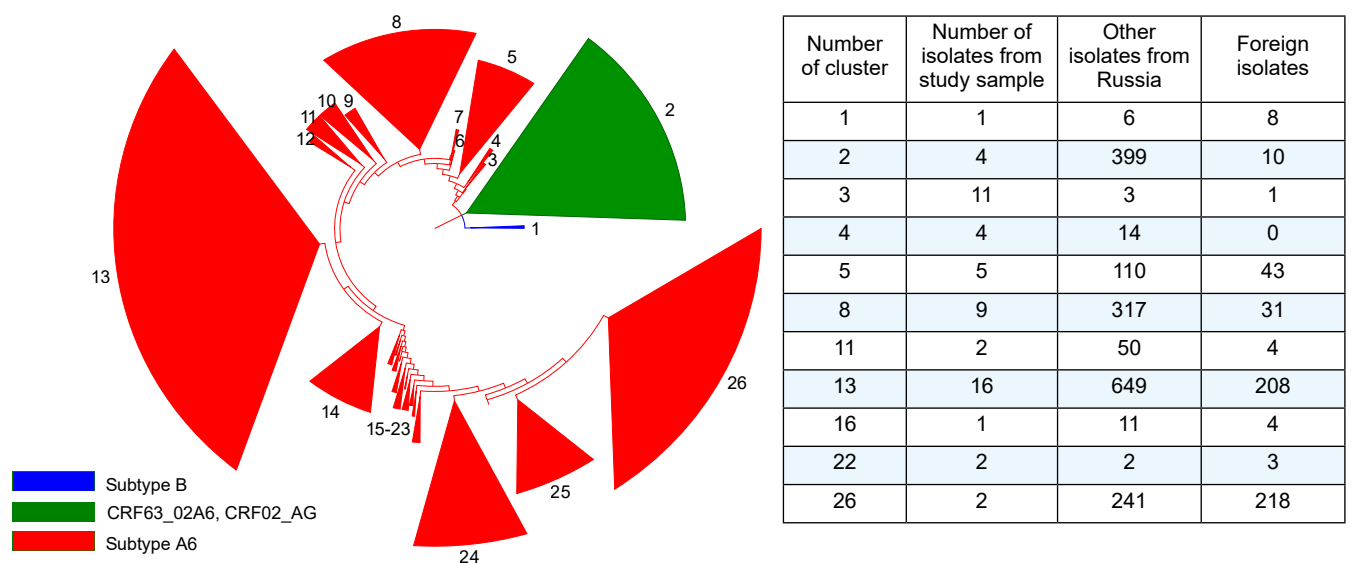


Fig. 3. Maxim-likelihood phylogenetic tree derived from 2929 HIV-1 *pol* gene (fragment encoding viral protease and part of reverse transcriptase) sequences which had 95% or more identity with studied ones.

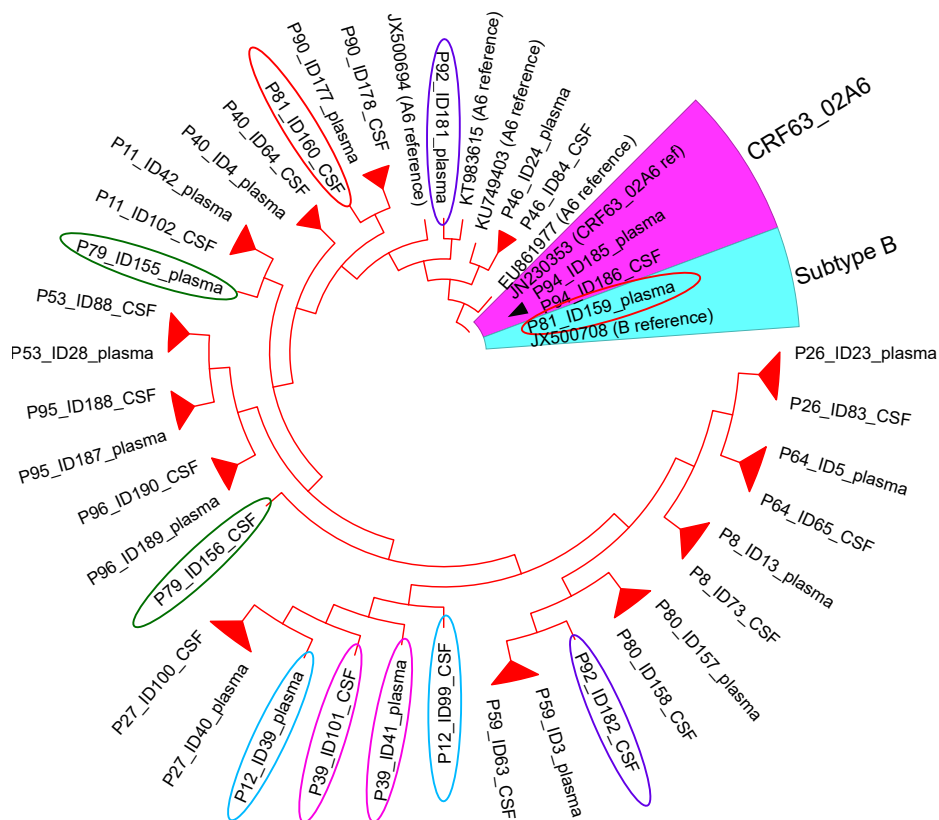


Fig. 4. Phylogenetic tree of 38 HIV-1 *pol* gene sequences from 19 patients obtained in pairs from blood plasma and CSF. Ovals of the same color indicate paired samples that have fallen into different clusters. Red branches and clusters contain HIV-1 subtype A6 sequences.

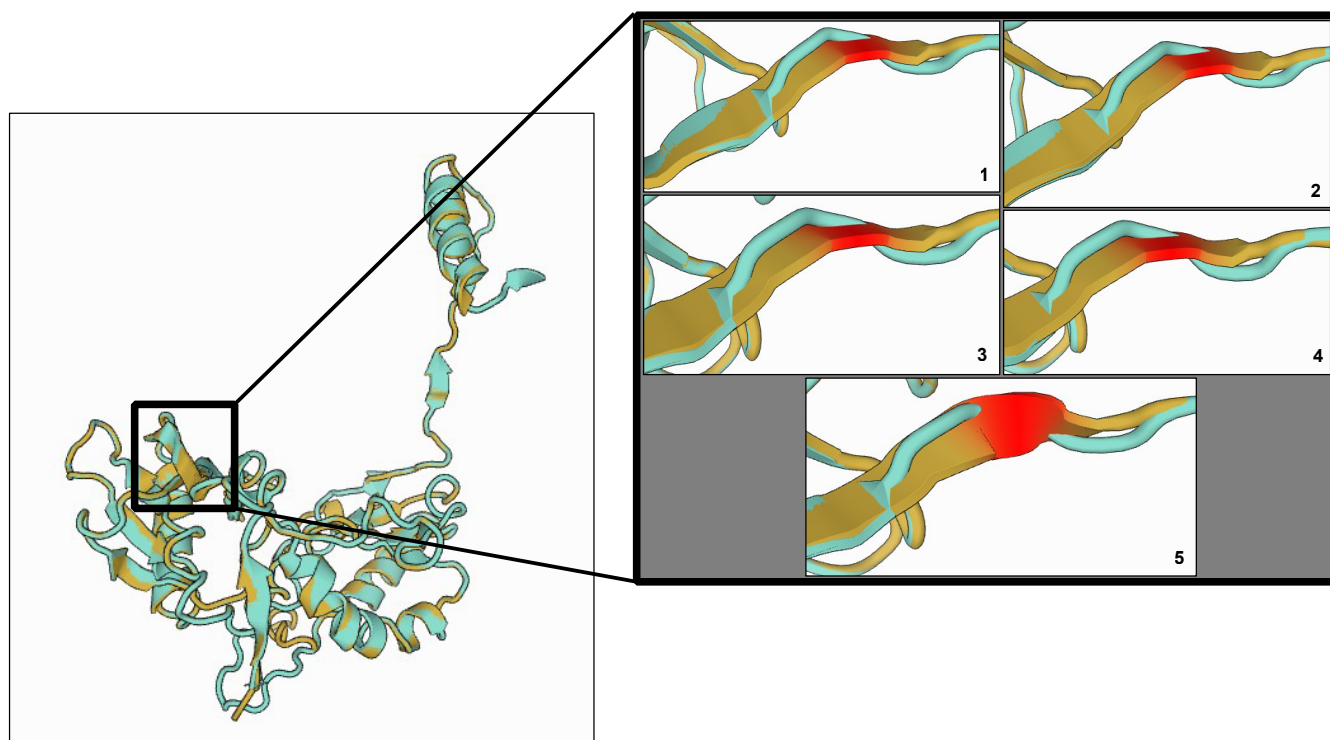


Fig. 5. Difference in the tertiary structure of HIV-1 reverse transcriptase p51 subunit between strains from blood plasma and from CSF.

Amino acid positions 16–20 are framed. Strain from blood plasma is shown in cyan, from CSF — in light brown. Amino acid position 18 is highlighted in red.

CSF, the number of independently occurring amino acid substitutions ranged from 2 to 7.

Comparison of the tertiary structure of proteins based on a model of the p51 subunit of HIV reverse transcriptase revealed 2 highly co-variable regions with differences between strains from plasma and those from CSF. In strains from plasma and CSF of 5 patients, the HIV-1 reverse transcriptase structures matched completely.

In strains from plasma and from CSF from the other 5 patients, differences in the reverse transcriptase structure were present at amino acid positions 16–20, which corresponds to the beginning of the fingers subdomain (**Fig. 5**).

At the end of the palm subdomain at positions 210–235, there also appeared to be a variable region where differences between strains of both plasma and CSF were detected in 8 pairs of images, including 5 pairs that exhibited a difference in structure at positions 16–20 (**Fig. 6**).

Other studies have observed that a site in the region of amino acid positions 219–230, which forms a disordered loop in the p51 subunit of HIV-1 reverse transcriptase, plays an important role in the dimerization process of the 2 subunits of the enzyme [41].

When comparing the tertiary structure of the p66 subunit of HIV-1 reverse transcriptase in 10 out of 14 patients, the structures of the enzyme in plasma and CSF strains coincided completely, while in another 3 patients there were regular repeated differences in amino acid positions 187–190 (immediately after catalytically active positions 185, 186) (**Fig. 7**).

This region is included in the binding site of NNRTIs to the enzyme [42].

As a result of even single amino acid substitutions in the microevolution process, the tertiary structure of reverse transcriptase changed, adapting to specific conditions of functioning. Such adaptation occurred independently in different compartments separated by the BBB. At the same time, only those amino acid substi-

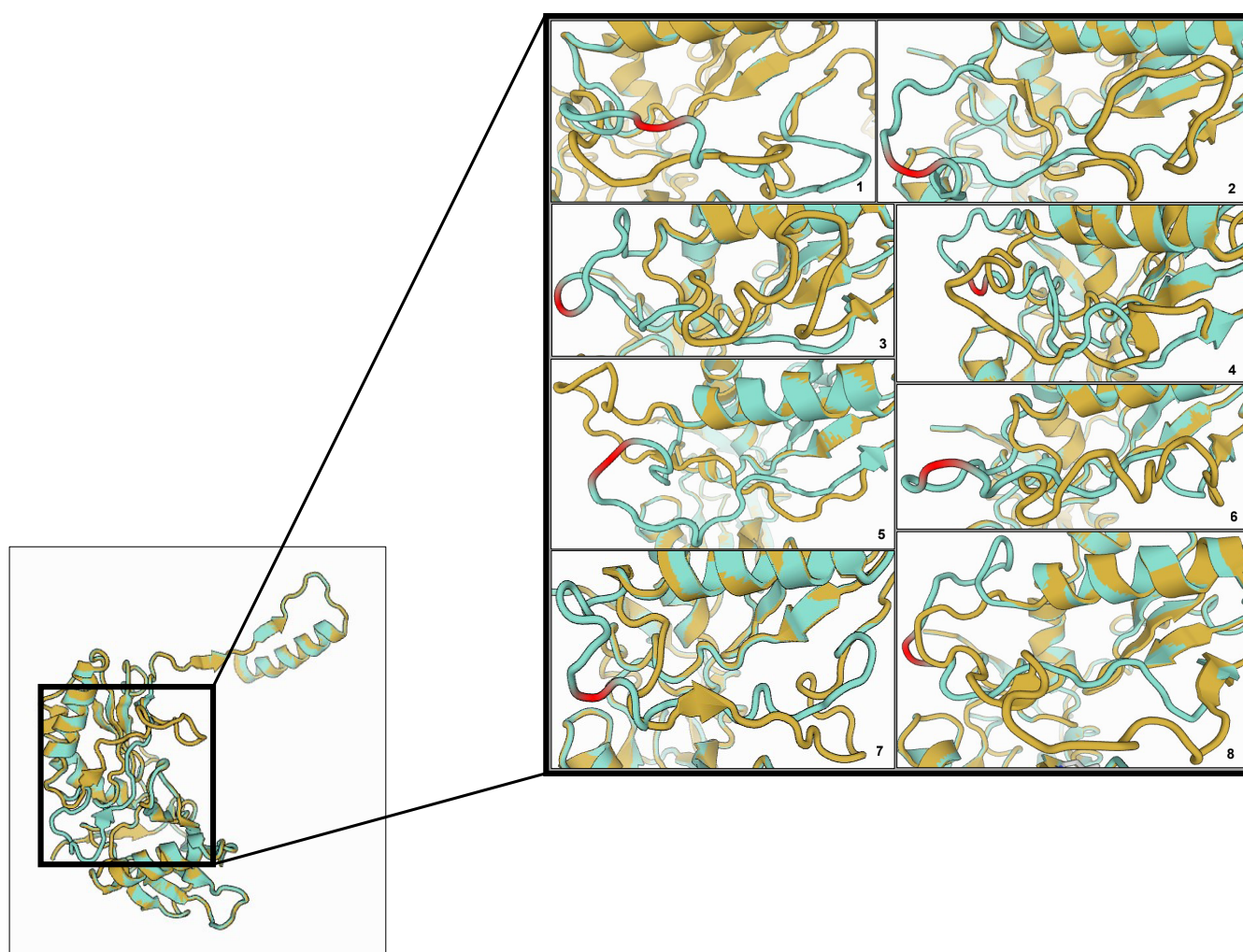


Fig. 6. Difference in the tertiary structure of HIV-1 reverse transcriptase p51 subunit between strains from blood plasma and from CSF.

Amino acid positions 210–235 are framed. Strain from blood plasma is shown in cyan, from CSF — in light brown. Amino acid position 220 is highlighted in red.

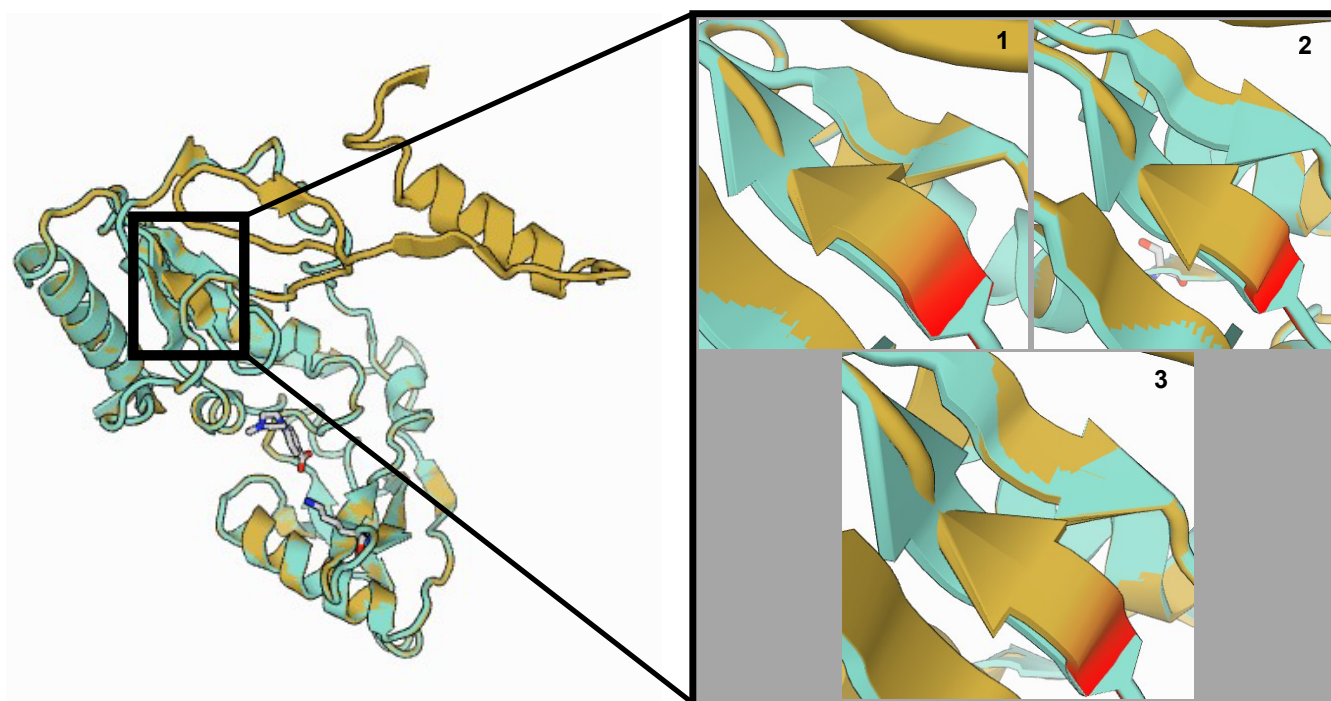


Fig. 7. Difference in the tertiary structure of HIV-1 reverse transcriptase p66 subunit between strains from blood plasma and from CSF.

Amino acid positions 187–190 are framed. Strain from blood plasma is shown in cyan, from CSF — in light brown.
 Amino acid position 187 is highlighted in red.

Amino acid substitutions, associated with HIV-1 reverse transcriptase (RT) tertiary structure alterations in strains from CSF and blood plasma

Patient ID	Accession number	Locus	Amino acid substitutions relative to HXB2 reference sequence	Differences in the tertiary structure of RT p51 subunit in positions 16–20	Differences in the tertiary structure of RT p51 subunit in positions 210–235	Differences in the tertiary structure of RT p66 subunit in positions 187–190
p8	OR260486	Blood plasma	T69S, Q242K			
	OR260531	CSF	E6D, K20E, E28K		+	+
p11	OR260523	Blood plasma	T39D			
	OR260482	CSF	T39N	+	+	
p26	OR260512	Blood plasma	–			
	OR260533	CSF	E28K, K64R	+	+	
p27	OR260521	Blood plasma	K11A, T39K, V60I			
	OR260480	CSF	K11T, E36D, T39E, K64R	+	+	
p53	OR260516	Blood plasma	–			
	OR260535	CSF	K64R, A158S		+	
p59	OR260517	Blood plasma	V35K, T39K, I47M			
	OR260528	CSF	T39R, K64R, D67N, T200A	+	+	
p95	OR260507	Blood plasma	E40D, D86N, L214F			
	OR260508	CSF	–	+	+	+
p96	OR260509	Blood plasma	V35T, T39M, S162H			
	OR260510	CSF	V35I, T39K, V60I, S162Y		+	
p46	OR260513	Blood plasma	V35K, F116Y			
	OR260534	CSF	T27P, V35T, S162C, D177N			+

tutions that are most optimal for the functioning environment of each HIV strain became fixed. Analysis of amino acid substitutions in the p51 and p66 subunits of reverse transcriptase demonstrated their relationship to differences in tertiary structure (**Table**).

The tertiary structure of the p51 subunit of HIV-1 reverse transcriptase turned out to be the most variable, with at least 2 evolutionary events related to amino acid substitutions, 1 in each strain, required for the emergence of conformational differences between proteins from blood plasma and CSF strains. The p51 subunit is catalytically inactive and plays only a structural role in the reverse transcription complex. Similar amino acid substitutions in the p66 subunit of the reverse transcriptase, which does have catalytic functions, did not result in changes in the tertiary structure. In 3 cases, differences in the tertiary structure of the p66 subunit were present but were minimal and covered a region 3 amino acids in length. Differences in the tertiary structure of the p66 reverse transcriptase subunit were associated with at least 3 evolutionary events in one of the strains or with 5 events in strains from CSF and plasma.

Conclusion

A statistically significant weak correlation between the HIV viral load level in plasma and CSF was revealed. The HIV viral load in blood plasma exceeded the values in CSF by 0.8 lg, or 6.3 times.

Phylogenetic analysis of the *pol* HIV-1 gene fragment encoding protease and part of reverse transcriptase demonstrates a high degree of heterogeneity, with part of the genome clustering with closely related strains circulating both in the near abroad countries of Ukraine and Kyrgyzstan, and in Central Europe: Poland and Germany. This may indicate a high frequency of HIV infections entering the region from abroad.

Comparison of HIV-1 *pol* gene regions (encoding protease and part of reverse transcriptase) between strains from blood plasma and from CSF revealed significant genetic distances between HIV-1 genomes in strains from 5 patients (in 1 case strains belonged to different subtypes — A6 in plasma and B in CSF).

The number of independent amino acid substitutions in the site encoding the viral protease ranged from 1 to 3 in plasma strains and from 1 to 2 in CSF strains. The number of amino acid substitutions in the site encoding the HIV-1 reverse transcriptase fragment ranged from 1 to 6 in blood plasma strains and from 1 to 7 in CSF strains.

Highly co-variable regions in the structure of the p51 subunit of HIV-1 reverse transcriptase were found at amino acid positions 16–20 and 210–235. In 5 patients, the structure of the enzyme in strains from blood plasma and CSF differed in both positions, and in 4 patients — only in positions 210–235. In 3 patients, the tertiary structure of the p66 subunit of HIV-1 reverse transcriptase differed in amino acid positions 187–190. This region is part of the NNRTI binding site. A much greater difference in the tertiary structure was observed in the p51 subunit, which is known to have no catalytic activity but plays an important structural role in the formation of the reverse transcription complex.

No differences were observed in the tertiary structure of the viral protease between strains from plasma and those from CSF. Amino acid substitutions in HIV-1 reverse transcriptase that lead to changes in the tertiary structure of one subunit will not necessarily result in changes in the other.

The described observations confirm the presence of a virus microevolution process, manifested by changes in both primary and tertiary structures of HIV-1 reverse transcriptase, proceeding in parallel and independently in the organism of one patient in different compartments separated by the BBB.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Bleasby K., Castle J.C., Roberts C.J., et al. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: A resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica*. 2006;36(10–11):963–88. DOI: <https://doi.org/10.1080/00498250600861751>
2. Ene L., Duiculescu D., Ruta S.M. How much do antiretroviral drugs penetrate into the central nervous system? *J. Med. Life*. 2011;4(4):432–9.
3. Qu Y., Weinstein A., Wang Z., et al. Legacy effect on neuropsychological function in HIV-infected men on combination antiretroviral therapy. *AIDS*. 2022;36(1):19–27. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003071>
4. Heaton R.K., Ellis R.J., Tang B., et al. Twelve-year neurocognitive decline in HIV is associated with comorbidities, not age: a CHARTER study. *Brain*. 2023;146(3):1121–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awac465>
5. Ferretti F., Mora-Peris B., Underwood J., et al. Cognitive impairment in a clinical setting. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*. 2018;77(1):e10–3. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001547>
6. Antinori A., Arendt G., Becker J.T., et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology*. 2007;69(18):1789–99. DOI: <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000287431.88658.8b>
7. Wang Y., Liu M., Lu Q., et al. Global prevalence and burden of HIV-associated neurocognitive disorder: A meta-analysis. *Neurology*. 2020;95(19):e2610–21. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000010752>
8. Sacktor N. Changing clinical phenotypes of HIV-associated neurocognitive disorders. *J. Neurovirol*. 2018;24(2):141–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13365-017-0556-6>
9. Valcour V., Chalermchai T., Sailasuta N., et al. Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. *J. Infect. Dis*. 2012;206(2):275–82. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis326>
10. Spudich S., González-Scarano F. HIV-1-related central nervous system disease: current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Cold Spring. Harb. Perspect. Med*. 2012;2(6):a007120. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007120>
11. Eugenin E.A., Osiecki K., Lopez L., et al. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J. Neurosci*. 2006;26(4):1098–106. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-05.2006>
12. Veenstra M., León-Rivera R., Li M., et al. Mechanisms of CNS viral seeding by HIV⁺ CD14⁺ CD16⁺ monocytes: establishment and reseeding of viral reservoirs contributing to HIV-associated neurocognitive disorders. *mBio*. 2017;8(5):e01280–17. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01280-17>
13. Yuan L., Qiao L., Wei F., et al. Cytokines in CSF correlate with HIV-associated neurocognitive disorders in the post-HAART era in China. *J. Neurovirol*. 2013;19(2):144–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13365-013-0150-5>
14. León-Rivera R., Veenstra M., Donoso M., et al. Central Nervous System (CNS) viral seeding by mature monocytes and potential therapies to reduce CNS viral reservoirs in the cART era. *mBio*. 2021;12(2):e03633–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.03633-20>
15. Lehmann M.H., Lehmann J.M., Erfle V. Nef-induced CCL2 expression contributes to HIV/SIV brain invasion and neuronal dysfunction. *Front. Immunol*. 2019;10:2447. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02447>
16. Mediouni S., Darque A., Baillat G., et al. Antiretroviral therapy does not block the secretion of the human immunodeficiency virus Tat protein. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2012;12(1):81–6. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152612798994939>
17. Paddick S., Holmes S., Ranasinghe S., et al. HIV-associated neurocognitive disorders (HAND) in a cART-treated cohort of adults aged 50 and over in Kilimanjaro, Tanzania: The first longitudinal follow-up study of HAND in an older population in sub-Saharan Africa: Neuropsychiatry and behavioral neurology/Dementia. *Alzheimer's & Dementia*. 2020;16(S6):e041971. DOI: <https://doi.org/10.1002/alz.041971>
18. Bergroth T., Ekici H., Gisslén M., et al. Difference in drug resistance patterns between minor HIV-1 populations in cerebrospinal fluid and plasma. *HIV Med*. 2009;10(2):111–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2008.00659.x>
19. St. Bernard L., Abolade J., Mohri H., Markowitz M., Evering T.H. Drug resistance mutation frequency of single-genome amplification-derived HIV-1 polymerase genomes in the cerebrospinal fluid and plasma of HIV-1-infected individuals under nonsuppressive therapy. *J. Virol*. 2020;94(20):e01824–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01824-19>
20. Nightingale S., Geretti A.M., Beloukas A., et al. Discordant CSF/plasma HIV-1 RNA in patients with unexplained low-level viraemia. *J. Neurovirol*. 2016;22(6):852–60. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0448-1>
21. Churchill M., Nath A. Where does HIV hide? A focus on the central nervous system. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2013;8(3):165–9. DOI: <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32835fc601>
22. Bavaro D.F., Calamo A., Lepore L., et al. Cerebrospinal fluid compartmentalization of HIV-1 and correlation with plasma viral load and blood-brain barrier damage. *Infection*. 2019;47(3):441–6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01268-8>
23. Bednar M.M., Sturdevant C.B., Tompkins L.A., et al. Compartmentalization, viral evolution, and viral latency of HIV in the CNS.: 2. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015;12(2):262–71. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11904-015-0265-9>
24. Olivieri K.C., Agopian K.A., Mukerji J., Gabuzda D. Evidence for adaptive evolution at the divergence between lymphoid and brain HIV-1 nef genes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2010;26(4):495–500. DOI: <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0257>
25. Gega A., Kozal M.J., Chiarella J., et al. Deep sequencing of HIV-1 variants from paired plasma and cerebrospinal fluid during primary HIV infection. *J. Virus Erad*. 2015;1(4):264–8.
26. Shahid A., MacLennan S., Jones B.R., et al. The replication-competent HIV reservoir is a genetically restricted, younger subset of the overall pool of HIV proviruses persisting during therapy, which is highly genetically stable over time. *J. Virol*. 2024;98(2):e0165523. DOI: [10.1128/jvi.01655-23](https://doi.org/10.1128/jvi.01655-23)
27. Hu W.S., Hughes S.H. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2012;2(10):a006882. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
28. Singh A.K., Das K. Insights into HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) inhibition and drug resistance from thirty years of structural studies. *Viruses*. 2022;14(5):1027. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14051027>
29. Madden T. Chapter 16. The BLAST sequence analysis tool. In: *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information (US); 2003.
30. Madeira F., Pearce M., Tivey A.R.N., et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W276–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
31. Liu T.F., Shafer R.W. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin. Infect. Dis*. 2006;42(11):1608–18. DOI: <https://doi.org/10.1086/503914>
32. Posada D., Crandall K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14(9):817–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.817>

33. Kumar S., Stecher G., Li M., et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
34. Apetrei C., Hahn B., Rambaut A., et al. *HIV Sequence Compendium 2021*. Los Alamos, New Mexico; 2021. URL: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2021/sequence2021.pdf>
35. Wilson E.B. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *J. Am. Stat. Association.* 1927;22(158):209–12. DOI: <https://doi.org/10.2307/2276774>
36. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis.* 2009;30(Suppl. 1):S162–73. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
37. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research.* 2018;46(W1):W296–303. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
38. Daliparty V.M., Balasubramanya R. *HIV Encephalitis*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
39. Jagtap S.B., Patil P.M. Clinical profile of neurological manifestations and CD4 counts in patient living with HIV cases and its outcome with treatment with ART at a tertiary hospital. *Med-Pulse International Journal of Medicine.* 2021;21(3):78–84. DOI: <https://doi.org/10.26611/10212033>
40. Ulfhammer G., Edén A., Antinori A., et al. Cerebrospinal fluid viral load across the spectrum of untreated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: a cross-sectional multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* 2022;75(3):493–502. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciab943>
41. London R.E. HIV-1 Reverse transcriptase: a metamorphic protein with three stable states. *Structure.* 2019;27(3):420–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.011>
42. Sarafianos S.G., Marchand B., Das K., et al. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J. Mol. Biol.* 2009;385(3):693–713. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.071>

Information about the authors

Mikhail V. Piterskiy[✉] — researcher, Ural Federal District AIDS Centre, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia, piterskiy_mv@niivirom.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5506-2389>

Oleg A. Khodakov — junior researcher, Ural Federal District AIDS Centre, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1493-6080>

Tatyana V. Mikheeva — Head, 1st Infectious diseases department, Clinic of the South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3371-9495>

Natalia V. Bilalova — Head, Arbitration laboratory of HIV and opportunistic infections, Ural Federal District AIDS Centre, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2693-5544>

Alena B. Konkova-Reidman — D. Sci. (Med.), Professor, Department of Infectious diseases, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6058-0997>

Yuliya A. Zakharova — D. Sci. (Med.), Professor, Scientific Director, Institute of Disinfectology, F.F. Erisman Federal Scientific Centre of Hygiene, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>

Aleksandr V. Semenov — D. Sci. (Biol.), Director, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Author contribution: *Piterskiy M.V.* — statistical and bioinformatics data processing and analysis, literature selection and analysis, text writing, editing; *Khodakov O.A.* — literature selection and analysis, bioinformatics data processing and analysis, text writing; *Bilalova N.V.* — collection and processing of biomaterial, sequencing; *Mikheeva T.V.* — collection and processing of biomaterial, data processing and analysis; *Konkova-Reidman A.B.* — concept and design of the study; editing; *Zakharova Yu.A.* — concept and design of the study, literature selection and analysis; *Semenov A.V.* — concept and design of the study, data analysis, text writing, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made final approval of the version to be published.

The article was submitted 15.10.2023;
accepted for publication 21.12.2023;
published 28.02.2024

Информация об авторах

Питерский Михаил Валерьевич[✉] — н.с. Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД Федерального научно-исследовательского института вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия, piterskiy_mv@niivirom.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5506-2389>

Ходаков Олег Александрович — м.н.с. Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД Федерального научно-исследовательского института вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1493-6080>

Михеева Татьяна Владимировна — зав. 1-го инфекционного отделения Клиники Южно-Уральского медицинского университета, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3371-9495>

Билалова Наталья Васильевна — зав. арбитражной лабораторией ВИЧ и оппортунистических инфекций Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД Федерального научно-исследовательского института вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2693-5544>

Конькова-Рейдман Алена Борисовна — д.м.н., профессор каф. инфекционных болезней Южно-Уральского медицинского университета, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6058-0997>

Захарова Юлия Александровна — д.м.н., проф., научный руководитель Института дезинфектологии Федерального научного центра гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>

Семенов Александр Владимирович — д.б.н., директор Федерального научно-исследовательского института вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Участие авторов: *Питерский М.В.* — подбор и анализ литературы, статистическая и биоинформационная обработка и анализ данных, написание текста, редактирование; *Ходаков О.А.* — подбор и анализ литературы, биоинформационная обработка и анализ данных, написание текста; *Билалова Н.В.* — сбор и обработка биоматериала, секвенирование; *Михеева Т.В.* — сбор и обработка биоматериала, обработка и анализ данных; *Конькова-Рейдман А.Б.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Захарова Ю.А.* — концепция и дизайн исследования, подбор и анализ литературы; *Семенов А.В.* — концепция и дизайн исследования, анализ данных, написание текста, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 15.10.2023;
принята к публикации 21.12.2023;
опубликована 28.02.2024

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-432>

Study of the circulation and properties of the West Nile virus in Russia in 2022

Andrey V. Toporkov, Elena V. Putintseva, Svetlana K. Udovichenko[✉], Natalya V. Boroday, Elena V. Molchanova, Olga S. Bondareva, Aleksander S. Antonov

Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russian Federation

Abstract

Introduction. The relevance of the study is due to the need to assess the real expansion of West Nile fever (WNF) in Russia, analyze the manifestations of epizootic and epidemic processes and study the population structure of West Nile virus (WNV).

Aim. To obtain objective data on the intensity of WNV circulation in certain territories of Russia and study the properties of the isolated strains of the pathogen.

Materials and methods. 4564 samples of field material from 23 subjects of the Russian Federation and 1547 samples of clinical material from 12 subjects of the Russian Federation were examined. A set of laboratory diagnostic methods was used: ELISA, RT-PCR, virological, sequencing.

Results. In 20 out of 1331 (1.5%) examined febrile patients, IgM antibodies to WNV were detected, including positive cases identified for the first time in the Karachay-Cherkess Republic, Tver and Vladimir regions. The presence of immunity to WNV was found on average in 8.6% of 11 federal subjects' population with high seroprevalence rates in Zaporozhye (24,5%), Tula (15,4%) and Kursk (11,1%) regions. Low-avidity IgG antibodies were detected in 44 (33,1%) samples from a population of 9 federal subjects. Intensive circulation of WNV lineage 2 in the epizootic cycle in the southern part of European Russia was confirmed. 12 WNV isolates were obtained, including those isolated for the first time in the Republic of Crimea, the Karachay-Cherkess Republic and the Stavropol Territory. The heterogeneity of circulating WNF causative agent's strains related to the two clades of the WNV lineage 2 formed in 2021 and 2022 was established.

Conclusions. In the course of comprehensive monitoring studies, a new northern border of the WNF range was established, which as of 2022 passes through the territory of the Tver region. Data from seroepidemiological studies, including the detection of low-avidity IgG antibodies, confirm fairly intense, but undiagnosed contact of the population of the European part of Russia with the WNF pathogen. In the southern region of the European part of Russia, WNV genotype 2 predominantly circulates, belonging to at least two clades formed in 2021 and 2022.

Keywords: *West Nile fever, pathogen monitoring, immunity, the properties of West Nile virus strains*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Volgograd Research Institute for Plague Control (protocol No. 3, April 25, 2022).

Acknowledgment. We express our gratitude to the heads and staff of the offices of Rospotrebnadzor in the regions of the Russian Federation, Centers of Hygiene and Epidemiology in the regions of the Russian Federation, research and anti-plague institutions of Rospotrebnadzor, for the organization and participation in the collection of material for the study.

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: Toporkov A.V., Putintseva E.V., Udovichenko S.K., Boroday N.V., Molchanova V.E., Bondareva O.S., Antonov A.S. Study of the circulation and properties of the West Nile virus in Russia in 2022. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):114–126.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-432>

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

Изучение особенностей циркуляции и свойств вируса Западного Нила в России в 2022 году

Топорков А.В., Путинцева Е.В., Удовиченко С.К.[✉], Бородай Н.В., Молчанова Е.В., Бондарева О.С., Антонов А.С.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Аннотация

Актуальность работы обусловлена необходимостью оценки реального распространения лихорадки Западного Нила (ЛЗН) в России, анализа эпизоотического и эпидемического процессов и изучения популяционной структуры вируса Западного Нила (ВЗН).

Цель — получить объективные данные об интенсивности циркуляции ВЗН на отдельных территориях России и изучить генетическое разнообразие и свойства выделенных штаммов возбудителя.

Материалы и методы. Исследовано 4564 пробы полевого материала из 23 субъектов Российской Федерации и 1547 проб клинического материала из 12 субъектов Российской Федерации. Использован комплекс методов лабораторной диагностики: иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, вирусологический, секвенирование.

Результаты. У 20 (1,5%) из 1331 обследованного лихорадящего пациента выявлены IgM к ВЗН, в том числе впервые в Карачаево-Черкесской Республике, Тверской и Владимирской областях. Наличие иммунной прослойки к ВЗН установлено в среднем у 8,6% населения 11 субъектов с высокими значениями серопревалентности в Запорожской (24,5%), Тульской (15,4%) и Курской (11,1%) областях. Низкоавидные IgG-антитела выявлены в 44 (2,8%) пробах у населения 9 субъектов. Подтверждена интенсивная циркуляция ВЗН 2-го генотипа в эпизоотическом цикле на юге европейской части России. Выделены 12 изолятов ВЗН, в том числе впервые в Республике Крым, Карачаево-Черкесской Республике и Ставропольском крае, изучены патогенные свойства вируса для беспородных белых мышей с определением инкубационного периода заболевания, рассчитана ЛД₅₀. Установлена неоднородность циркулирующих штаммов возбудителя ЛЗН, относящихся к двум кладам ВЗН 2-го генотипа, сформированным в 2021 и 2022 гг.

Выводы. В ходе комплексных мониторинговых исследований установлена новая северная граница ареала ЛЗН, которая по состоянию на 2022 г. проходит на территории Тверской области. Данные сероэпидемиологических исследований, в том числе с обнаружением низкоавидных IgG-антител, подтверждают достаточно интенсивный, но не диагностированный контакт населения европейской части России с возбудителем ЛЗН. В южном регионе европейской части России преимущественно циркулирует ВЗН 2 генотипа, относящийся как минимум к 2 кладам, сформированным в 2021 и 2022 гг.

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, мониторинг за возбудителем, иммунная прослойка, штаммы вируса Западного Нила

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2022).

Благодарность. Выражаем благодарность руководителям и сотрудникам Управлений Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации, Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, научно-исследовательских и противочумных учреждений Роспотребнадзора за организацию и участие в сборе материала для исследования.

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: Топорков А.В., Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Бородай Н.В., Молчанова Е.В., Бондарева О.С., Антонов А.С. Изучение особенностей циркуляции и свойств вируса Западного Нила в России в 2022 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):114–126.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-432>

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

Introduction

The wide territorial distribution of West Nile fever (WNF) in Russia, annual registration of disease cases, including epidemic outbreaks, detection of severe forms and fatal outcomes determine the necessity for constant and systematic epidemiological surveillance of this infection [1, 2]. However, the significant reduction in the volume and quality of monitoring studies of WNF pathogen in Russia observed in recent years makes it difficult to conduct an objective analysis of WNF symptoms and to develop a forecast of the epidemiological situation. Thus, the number of examined patients with WNF-like symptoms in 2020 and 2021 decreased by 5.7 and 4.2 times relative to the figures for 2019, and the volumes of zoological and entomological study material decreased by 2.1 and 1.5 times, respectively. During the same period, WNF pathogen markers were detected by practical institutions of Rospotrebnadzor only in 3 and 7 subjects of Russia [3].

Given the above, one of the key objectives of the Reference Center on WNF pathogen monitoring is to conduct active reconnaissance monitoring of WNF, which allows obtaining reliable information on the intensity of epizootic and epidemic processes. Our studies conducted in 2020–2021 against the background of a low level of officially registered WNF incidence in Russia (10 and 6 times lower than the average annual value, respectively) confirmed the ongoing intensive contact with the pathogen among the population of the Republics of Kalmykia, Crimea, Adygea, Krasnodar Territory, Volgograd and Astrakhan regions [3].

There is a serious problem of establishing the range of WNF in Russia, which is justified by the confirmation of local cases of West Nile Virus (WNV) infection only in 26 federal subjects, while in most of the country (48 federal subjects) only fragmentary data have been obtained, indicating signs of immunity to the WNV among the population and/or detection of markers of the pathogen in zoological and entomological material. As of 2022, the circulation of WNV has not been confirmed in the territory of 11 federal subjects.

The study of the population structure and distribution of various genetic lines of WNV in Russia remains a relevant area of research. It is known that the circulation of WNV genotypes 1, 2 and 4 has been confirmed in Russia [1, 4]. A study of the genome structure of the WNF pathogen circulating in the early 2000s in the south of the European part of the country, the south of Western Siberia, and the Far East demonstrated the predominance of WNV genotype 1a [5–7]. Subsequently, circulation of WNV of two epidemically significant genotypes – 1a and 2 with the predominance of the latter, and genotype 4 in the southern regions was demonstrated in a number of territories of the European part of Russia [4, 7]. Nowadays, due to a decrease in the volume of WNF pathogen monitoring studies, there are only limited data on the circulation of WNV genotype 2.

At the same time, the discovery in 2021 of the WNV genotype 2 variant, which has never been found in Russia before [3], determines the necessity to strengthen the WNF pathogen monitoring system to obtain information on the properties of circulating strains, to assess their impact on the clinical picture of the disease and specific features of the epidemic process, and to understand the probable ways of virus entry and spread.

The aim of the study is to obtain objective data on the intensity of WNV circulation in certain territories of Russia and study the genetic diversity and properties of isolated strains of the pathogen.

Materials and methods

Active monitoring of the WNF pathogen in the 2022 season was conducted in 23 federal subjects of Russia by the Volgograd Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor in cooperation with specialists from the Center for Hygiene and Epidemiology, research and anti-plague institutions of Rospotrebnadzor. Collection of blood-sucking arthropods, capture of small mammals and birds, preparation of samples for examination were carried out in accordance with Sanitary rules and regulations 3.3686-21, MG 3.1.3.2600-10 and MR 3.1.0211-20. Arthropods were pooled by species, date and place of collection: mosquitoes — from 2 to 30 specimens, ticks — from 1 to 7 specimens.

Blood samples were collected in 11 federal subjects of the Russian Federation in July–August 2022 from febrile patients undergoing outpatient or inpatient treatment for diseases unrelated to WNF (acute respiratory viral infections, COVID-19, somatic diseases, etc.). In the Zaporozhye region, blood serum samples of donors received from the Melitopol Regional Blood Center in October 2022 were used. The study was conducted with voluntary informed consent of patients. The study protocol was approved by the Bioethics Commission of the Volgograd Anti-Plague Scientific Research Institute (protocol No. 3 of 25.04.2022).

Laboratory tests were conducted at the Volgograd Anti-Plague Scientific Research Institute, except for material from the Zaporozhye region and the Republic of Crimea, which was examined in the laboratory of the mobile complex of the Specialized Anti-Epidemic Brigade of Rospotrebnadzor. A total of 1,547 samples of clinical material and 4,564 samples of field material (3,181 samples of mosquitoes of 28 species, 1 sample of blood-sucking midges of 1 species, 2 samples of blood-sucking flies of 1 species, 1,373 samples of ixodes ticks of 15 species, 10 samples of argas ticks of 1 species, 283 samples of bird brain of 29 species, 325 samples of small mammal organs of 14 species) were examined.

Screening of biological material samples for the presence of WNV RNA was performed using the

AmpliSens WNV-FL reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor), WNV typing — Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 (Volgograd Anti-Plague Scientific Research Institute).

The VectoNil-IgG and VectoNil-IgM (Vector-Best) commercial kits were used for detection of IgM and IgG antibodies to WNV in sera. In samples positive for the presence of IgG antibodies, the avidity index was determined using the VectoNil-IgG-avidity kit (Vector-Best). In cases of detection of IgM and/or IgG antibodies to WNV in serum samples from persons living in areas endemic for viral tick-borne encephalitis, paired quantitative studies of antibodies to WNV and tick-borne encephalitis virus (TBEV) were performed. Determination of antibodies to TBEV was performed using VectoTBEV-IgM and VectoTBEV-IgG reagent kits (Vector-Best). In cases of a significant excess of serum antibodies to WNV compared to TBEV or absence of antibodies to TBEV, a decision was made in favor of the specificity of the detected antibodies to WNV.

The sources of information on the number of registered WNF cases were statistical surveillance forms No. 2 "Information on Infectious and Parasitic Diseases" in the Russian Federation for 2009–2022. Information on the level of immunity to WNV among the population of the surveyed territories was the reported data submitted by the Rospotrebnadzor offices in the subjects of the Russian Federation to the Reference Center, and materials of scientific publications.

Virus isolation was performed according to the classical protocol by infecting a monolayer of Vero cell line with the supernatant of biological material samples in which WNV RNA was detected [8]. To achieve sufficient infectious activity, each isolate was passaged three times on the Vero cell line culture. The study of pathogenic properties was carried out in relation to 22 WNV strains isolated from 2018 to 2022 from samples of field material and stored in the working collection of the Volgograd Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor (**Table 1**). In order to study the pathogenic properties of these strains, mongrel white mice were injected intramuscularly with 100 µl of ten times-passaged virus-containing material. The animals were monitored and their deaths were recorded for 21 days after infection. The LD₅₀ was calculated using Kerber's formula modified by Ashmarin. Statistical processing of the data was performed using the Mann–Whitney criterion.

Total RNA was isolated from the inactivated filtered supernatant of the Vero cell line using the RNeasy Mini Kit, RNeasy Mini Spin Columns kit (Qiagen). Preparation of libraries for sequencing was performed according to the method proposed by L.A. Moser et al. [9]. Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (Illumina corp.) using the MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) (Illumina corp.). Sequences were assembled *de novo* and to the reference ge-

nome of WNV (GenBank accs. NC_001563.2) using Cutadapt 2.9, Samtools 1.9, Bcftools 1.9, bwa 0.7.17-r1188 and SPAdes v3.15.1 software products, combined into pipelines using custom scripts implemented in Python 3 language. Nucleotide sequences of the complete genomes of WNV isolates with a potential glycolysis site identified at position N1433 of the NS2B protein were deposited in the international GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) under registration numbers OP345101, OP345085, OP345086, OP345087, OP345088, OP345089, OP345090, OP345091, OP345092, OP345093, OP345094, OP345098, OP345099, OP345100, OR159869, OQ214888, OR159871, OR159873, OQ214890, OR159872, OQ214891.

Results

When examining 1331 blood serum samples from febrile patients, IgM antibodies to WNV were detected in 20 (1.5%) cases (**Table 2**). Based on the clinical picture of the disease and the results of laboratory examination, all patients whose sera contained IgM antibodies to WNV, indicating the acute phase of the infectious process, were diagnosed with WNF by medical specialists. WNV RNA was not detected in the tested samples.

In the Karachay-Cherkess Republic, Vladimir and Tver regions, local cases of WNF were registered for the first time, which allows us to speak about the established expansion of the area of this infection.

Studies conducted by the Reference Center specialists confirmed human WNV infection in the Tambov region (Table 2), where the first local case of WNF was detected by specialists of a medical organization in April 2022.

In the rest of the Russian regions, the incidence was officially registered earlier. Manifestations of WNF had an outbreak character only in the Lipetsk Region (2012 — 35 patients) with subsequent registration of sporadic cases in 2013 (4), 2015, 2017, 2021 (1 each), 2016 (3), 2019 (6) [10]. In Ulyanovsk Region until 2022, WNF cases were detected in 2009 (1 patient), 2012 (4); in Belgorod Region — in 2012 (5), 2013 (2), 2014 (1); in Kursk Region — in 2012 (1) and 2019 (4); in Tula Region — in 2021 (1); in Samara — in 2012–2014 (9 each), 2015 (4), 2016–2017 (3 each), 2019 (2); in Zaporozhye — in 2009 (11), 2011 (5), 2012 (10), 2018 (8), 2019 (4); in Stavropol Territory — in 2012 (2), 2018 (2), and 2019 (4) [11].

The presence of immunity to WNV was found in an average of 8.6% of the population living in the territory of 11 subjects (Table 2). The data obtained indicate the continued contact of the population with the WNF pathogen and the necessity to strengthen epidemiologic surveillance activities.

When comparing the results of our studies with the average level of immunity to WNV among the population of the surveyed subjects for 2009–2022, similar

Table 1. West Nile virus strains from the collection of the Volgograd Anti-Plague Scientific Research Institute, used in the study

No.	Strain name		Selection source	Location of vector/host
	collection of the Volgograd Plague Control Research Institute	Department of collection of microorganisms, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR		
1	Volg601/18	V-959	<i>Culex modestus</i>	Volgograd Region
2	Volg696/18	V-960	<i>Culex pipiens</i>	Volgograd Region
3	Volg723/18	V-961	<i>Culex pipiens</i>	Volgograd Region
4	Volg774/18	–	<i>Culex spp.</i>	Volgograd Region
5	Volg829/18	V-962	<i>Culex pipiens</i>	Volgograd Region
6	Volg840/21	V-1203	<i>Culex pipiens</i>	Volgograd Region
7	Voronezh796/21	–	<i>Culex pipiens</i>	Voronezh Region
8	Volg701/21	V-1202	<i>Culex pipiens</i>	Volgograd Region
9	Astrahan962/21	–	<i>Culex modestus</i>	Astrakhan Region
10	Rostov 362/21	–	<i>Corvus frugilegus</i>	Rostov Region
11	Krim221/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Republic of Crimea
12	Krim233/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Republic of Crimea
13	Krim245/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Republic of Crimea
14	Klmk499/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Republic of Kalmykia
15	Klmk 502/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Republic of Kalmykia
16	Volg 565/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Volgograd Region
17	KCHR755/22	–	<i>Culex modestus</i>	Karachay-Cherkess Republic
18	Volg 912/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Volgograd Region
19	Volg 911/22	V-1388	<i>Culex modestus</i>	Volgograd Region
20	Stavropol1516/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Stavropol Territory
21	Stavropol1451/22	V-1389	<i>Culex pipiens</i>	Stavropol Territory
22	Astrahan1031 /22	–	<i>Culex pipiens</i>	Astrakhan Region

seroprevalence rates were found in Stavropol Territory (5.9%), Belgorod (8.1%), Lipetsk (3%), Ulyanovsk (2.9%), and Samara (3.9%) regions. A noteworthy result is the high percentage of positive findings for IgG antibodies to WNV in Tula (15.4%) and Kursk (11.1%) regions, where only a few WNF patients have been observed. As for the Tver Region, the presence of antibodies to WNV in the local population during routine monitoring was detected once in 2014 (1.3%), in the Tambov Region — in 2012 (2.6%), in the Vladimir Region — in 2016 (3%). There were no official reported data on the immunity to WNV among the population of the Karachay-Cherkess Republic and Zaporozhye Region.

In the samples positive for IgG antibodies, avidity was assessed in order to determine the age of contact with the pathogen. It was found that 44 blood serum samples from the population of 9 subjects contained

low-avid IgG antibodies, indicating infection with WNV in the previous 2–3 months.

Circulation of WNV in the epizootic cycle in 2022 in the south of European Russia was confirmed in all the surveyed territories, except for the Republic of Adygea (**Table 3**). A high proportion of positive findings among blood-sucking mosquitoes was found in Stavropol Territory (8.2%), Volgograd Region (5.9%) and Karachay-Cherkess Republic (3.8%), which indicated a significant epidemiologic risk for the population there.

In the oldest WNF focus, Astrakhan Region, while the percentage of PCR-positive samples of bloodsucking mosquitoes was low (0.3%), a high proportion of positive findings (3.2%) was found in samples of ixodid ticks. The detection rate of WNV among ixodid ticks of *H. marginatum* species taken from cattle was 16% (4 out of 25 samples).

Table 2. The total results of serosurvey for the antibodies to WNV in certain territories of European part of Russia

No.	Name of the constituent entity	Number of samples	Detection of antibodies to WNV					
			IgM		IgG		low avidity IgG	
			n	%	n	%	n	%
1	Karachay-Cherkess Republic	105	1	0,9	6	5,7	0	0
2	Tula Region	104	0	0	16	15,4	4	3,8
3	Ulyanovsk Region	146	2	1,4	5	3,4	2	1,4
4	Tver Region	100	7	7,0	3	3,0	1	1
5	Samara Region	101	0	0	6	6,0	1	1
6	Tambov Region	108	4	3,7	1	0,9	0	0
7	Kursk Region	117	2	1,7	13	11,1	6	5,1
8	Stavropol Territory	239	3	1,3	12	5,0	5	2,1
9	Vladimir Region	54	1	1,8	0	0	0	0
10	Belgorod Region	154	0	0	13	8,4	1	0,6
11	Lipetsk Region	103	0	0	5	4,9	1	1
12	Zaporozhye Region	216	–	–	53	24,5	23	10,6
Total		1547	20	1,5	133	8,6	44	2,8

Note. The dash means no studies have been conducted.

In the Volgograd Region, the detection of WNV markers in mosquitoes in 2022 was comparable to the indicators of previous years. However, for the first time in the long-term period of the Reference Center studies, 78.6% of all positive findings in the Volgograd Region were in *Ae. vexans* and *Ae. caspius* mosquitoes collected in late June, which confirmed the active epizootic process and was considered by us as a harbinger of possible epidemiological ill health.

The detection rate of WNV markers of blood-sucking mosquitoes in 2022 in the Republic of Kalmykia amounted to 2.3%. With signs of epizootic process activity almost annually observed in this territory, the disease incidence has not been officially registered here since 2013. The species composition of mosquitoes as potential vectors of WNV in the Republic of Kalmykia remains poorly studied. In 2022, based on the results of the entomological survey by the Reference Center specialists, the species composition of mosquitoes was supplemented with *Anopheles algeriensis* and *Coq. richardii* species.

In the Republic of Adygea in 2022, the infestation of carriers and vectors with WNV has not been determined. Unlike other subjects of southern Russia, where high numbers of *Cx. pipiens* species mosquitoes are maintained due to the presence of water reserves in artificial tanks on household plots, in Adygeya, due to the high level of moisture, such breeding sites are prac-

tically absent. One of the competent vectors of WNV, *Cx. modestus*, was not detected here either. However, in the Republic of Adygea we detected *Ae. koreicus* species mosquitoes (Maykop), the presence of which in this area is not described in available publications.

In the Republic of Crimea, the proportion of mosquito samples positive for WNV RNA was 2%, while in urbanized habitats this indicator was significantly higher, reaching 4.1%. The majority of positive findings were made by *Ae. caspius* species mosquitoes, which was the common eudominant species in urbanized and suburban biotopes. All findings in 2022 were detected in vector samples captured in the north of Crimea (Krasnoperekopsk district), where WNV circulation had not been previously established.

Among the subjects of the center of European Russia and Western Siberia, markers of WNF pathogen in zoological and entomological material were detected only in the territory of the Tula Region (Table 3).

Summarizing the data of field studies using the molecular genetic method, we note that in vector samples, WNV RNA was detected predominantly in low concentrations. In 43 (79.6%) of 54 samples, the threshold cycle (Ct) value exceeded 28 and indicated the prevalence of relatively low viral load among infected mosquitoes and ticks. High concentrations of WNV RNA (Ct values: 8.98; 10.2; 14.55; 15.55; 15.77) were detected only in 5 vector samples (4 samples of

Table 3. The volumes and results of laboratory tests for WNV RNA presence in entomological material

No.	Name of the constituent entity	Mosquitoes			Клещи Ticks		
		number of pools	number of positive pools, %	structure of positive pools	number of pools	number of positive pools, %	structure of positive pools
1	Volgograd Region	474	28 (5,9)	12 — <i>Aedes vexans</i> , 10 — <i>Ae. caspius</i> , 1 — <i>Anopheles hyrcanus</i> , 2 — <i>Culex modestus</i> , 3 — <i>Cx. pipiens</i>	372	1 (0,3)	1 — <i>Hyalomma marginatum</i>
2	Astrakhan Region	338	1 (0,3)	1 — <i>Cx. pipiens</i>	124	4 (3,2)	4 — <i>H. marginatum</i>
3	Rostov Region	27	1 (3,7)	1 — <i>Ae. caspius</i>	21	1 (4,8)	1 — <i>Ixodes ricinus</i>
4	Zaporozhye Region	203	6 (3)	6 — <i>Cx. pipiens</i>	192	0	
5	Republic of Crimea	693	14 (2)	9 — <i>Ae. caspius</i> , 4 — <i>Cx. modestus</i> , 1 — <i>Cx. pipiens</i>	—	—	—
6	Republic of Kalmykia	174	4 (2,3)	4 — <i>Cx. pipiens</i>	95	0	—
7	Republic of Adygea	91	0		57	0	—
8	Karachay-Cherkess Republic	78	3 (3,8)	2 — <i>Cx. modestus</i> , 1 — <i>Cx. pipiens</i>	7	0	—
9	Stavropol Territory	110	9 (8,2)	9 — <i>Cx. pipiens</i>	99	0	—
10	Belgorod Region	18	0	—	0	0	—
11	Kursk Region	166	0	—	59	0	—
12	Lipetsk Region	315	0	—	61	0	—
13	Tambov Region	20	0	—	11	0	—
14	Tver Region	11	0	—	23	0	—
15	Tula Region	142	1 (0,7)	1 — <i>Coquillettidia richiardii</i>	5	0	—
16	Vladimir Region	40	0	—	57	0	—
17	Samara Region	171	0	—	36	0	—
18	Ulyanovsk Region	110	0	—	0	0	—
19	Kemerovo Region	0	0	—	16	0	—
20	Novosibirsk Region	0	0	—	36	0	—
21	Omsk region	0	0	—	12	0	—
22	Khanty-Mansi Autonomous District	0	0	—	28	0	—
23	Tyumen region	0	0	—	72	0	—
Total		3181	67	—	1383	6	—

Cx. pipiens and 1 sample of *H. marginatum*).

According to the results of typing of positive samples, the isolated RNA fragments of WNV were found to belong to genotype 2 in 27 (50%) out of 54 samples: in samples of *Cx. pipiens* mosquitoes caught in the Republic of Kalmykia, Astrakhan Region and Stavropol Territory; *Cx. pipiens*, *An. hyrcanus*, *Cx. modestus*, *Ae. vexans*, *Ae. caspius* mosquitoes in the Volgograd

Region; *Ae. caspius* mosquitoes and *I. ricinus* ticks in the Rostov Region. Genotypes 1 and 4 of WNV were not identified in the samples

Genotyping of samples in which the concentration of WNV RNA was below the limit of detection of the Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit (1×10^4 copies/mL) was difficult. In samples with a Ct value ≥ 30 , genotyping was possible in 6 (21.4%) of 28

samples, Ct = 28–30 — 66.7%, while in samples with Ct values < 28 — in 100% of the samples tested.

Given the low concentration of the pathogen in the native material, in order to obtain isolates of WNV and study their biological and molecular genetic properties, the virus was accumulated in cell culture. In 2022, 12 WNV isolates were obtained: 3 from the Republic of Crimea, 2 from the Republic of Kalmykia, 1 from the Karachay-Cherkess Republic, 3 from the Volgograd Region, 1 from the Astrakhan Region, and 2 from the Stavropol Territory.

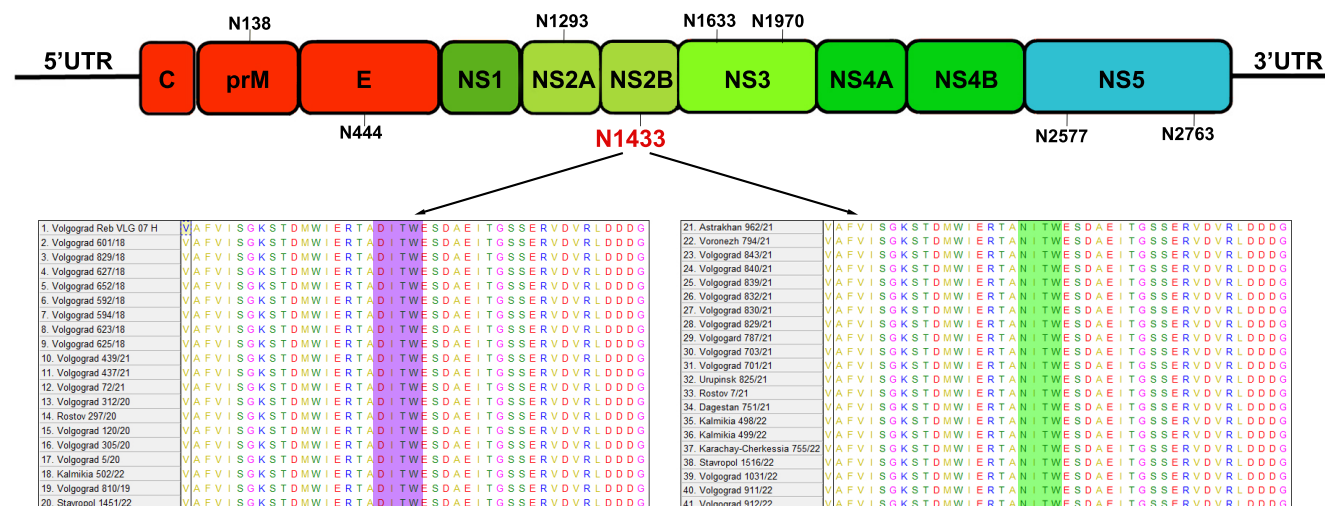
For the strains of WNV isolated in 2022, we have established the features of the course of infection in mongrel white mice with the determination of the incubation period of the disease and calculated the LD₅₀. As a result of infection of laboratory mice, regardless of the used strain of WPN isolated in 2022, the animals developed only influenza-like form of the disease and showed the following symptoms: wet fur, adynamia, chills, drowsiness. In contrast, 20% of mice infected with the strains isolated in 2018 and 2021 developed the disease with signs of nervous system damage in the form of monoplegia and serous meningitis [12].

Animal mortality was observed on average from day 10 to day 14, which, when compared with the data obtained for the strains isolated in 2018 and 2021 (day 3–14 and day 6–14, respectively), suggests a trend towards longer incubation periods. The mean LD₅₀ of the strains isolated in 2022 was 10⁴–10⁵ BOU, while the LD₅₀ of the strains isolated in 2018 and 2021 was 10³–10⁴ BOU. Lethality for the strains isolated in 2022 averaged 22% and was statistically significantly different from that of the strains isolated in 2018 (60%) and 2021 (40%) at a significance level of *p* = 0.05. However, when infected with strains from the Astrakhan Region and Stavropol Territory, lethality

amounted to 57% and was comparable to previously isolated strains.

Comparative analysis of the full-genome sequences of 12 isolates of WNV showed that 2 of them, isolated in the territory of the Republic of Kalmykia and Stavropol Territory in 2022, form a new distinct clade. The topology of the phylogenetic tree indicates a possible African origin of WNV. This genetic variant was probably introduced into Russia by migratory birds. The remaining 10 isolates belonged to the virus clade formed in 2021 by isolates isolated in Volgograd, Astrakhan, Rostov, Voronezh regions and the Republic of Dagestan. It is noteworthy that in 2022, simultaneous circulation of isolates of both the clade of WNV genotype 2, formed in 2021, and isolates of a new genetic variant was detected in the territory of the Republic of Kalmykia and Stavropol Territory.

We analyzed 44 amino acid complete coding sequences of WNV isolates isolated in 2018–2022 in Russia and performed a comparative analysis with the genotype 2 reference NC_001563, as well as with isolates circulating in Europe. We have identified a number of glycosylation sites that are common to WNV isolates circulating in Russia and European countries. It is known that glycosylation sites play a key role in the interaction of the virus with host cells and they are the so-called hot spots in the adaptive variability of WNV. Also, a potential glycosylation site at position N1433 of the NS2B protein was identified for the first time in a number of isolates isolated in 2021 and 2022 in Russia (Figure). Interestingly, this mutation is absent both in the genotype 2 reference and in isolates from European countries. The study did not show that isolates possessing this glycosylation site are confined to specific territories or to currently known genetic variants of genotype 2 of WNV.



Results of the analysis of glycosylation sites of WNV genetic variants circulating in Russia.

Glycosylation sites identified using NetNGlyc-1.0 are indicated by coordinates on the map of the WNV genome. The green color indicates the glycosylation site in a number of isolates identified in the period from 2021 to 2022. The NS2B protein sequence of isolates lacking this glycosylation site is highlighted in purple.

Discussion

Laboratory-confirmed cases of WNF in the Tver and Vladimir regions are the first evidence of local transmission of WNV in these territories. It cannot be excluded that cases of the disease among the population here could have occurred earlier but were not diagnosed by medical specialists, since only a few patients have been tested for WNF markers in these subjects. Our assumption can be supported by the data on immunity to WNF among residents of the Vladimir Region (3% in 2015), as well as the confirmation in 2021 of autochthonous cases in the Moscow Region [13]. In the Tver Region, negative results were obtained according to the data from previous serological and epidemiological studies (2013) [14].

In the territory of the Karachay-Cherkess Republic, WNV circulation has not been established until 2022, which is probably due to the lack of comprehensive monitoring of the WNF pathogen. At the same time, the incidence, including outbreaks, has been confirmed in the neighboring territories — Krasnodar and Stavropol. Summarizing our data on local case detection, vectors infected with WNV and immunity among the population, the territory of the Karachay-Cherkess Republic was proved to be endemic for WNF.

The failure to detect WNV RNA in clinical samples is likely to be due to the fact that the material was collected for testing late in the course of the disease, when the concentration of the virus in the blood decreases sharply. According to the data submitted to the Reference Center by the Rospotrebnadzor offices in the constituent entities of the Russian Federation, the average period of sampling from the onset of clinical symptoms was 6 days, and the maximum was 14 days. The short duration of viremia can be inferred from the course of the disease, which in 85% of patients was mild and characterized by short-term fever.

The values of seroprevalence to WNV obtained by the Reference Center in the Ulyanovsk, Lipetsk, Belgorod, Samara, and Stavropol regions are generally comparable to the values detected during routine serological monitoring. In Kursk Region, the level of immunity to WNV was significantly higher than the indicators established in 2017–2021 during serologic monitoring by Rospotrebnadzor institutions (0.5–1.3%). A similar pattern was noted for the Tula Region, where negative results were obtained in serosurveys performed among healthy population in certain years. However, according to scientific publications, the etiologic role of WNV was confirmed here in 4 febrile patients hospitalized in medical organizations of Tula back in the summer of 2012, and IgG antibodies were detected in 1.5% of those examined [15]. Thus, the seroprevalence of the population of these territories established by us can characterize the high degree and frequency of their contact with the WNF pathogen in the season of 2022.

It is interesting to note that the level of population immunity to WNV in the Zaporozhye Region was comparable to the indicators obtained in the territories of Russia with high epidemic danger, such as Volgograd, Rostov, Astrakhan regions. So far, data on the spread of WNF in Zaporozhye Region have been limited. In available sources there are reports on sporadic cases disease, and there is no information about the immunity of the population to the WNF pathogen in the modern period.

The intensity of the epizootic process in almost all the surveyed territories in the south of European Russia did not correspond to the number of officially registered cases of the disease, which did not exceed 1–3 WNF patients per subject. Apparently, this observation may be associated with a decrease in the efficiency of detection of WNF patients by specialists of medical organizations. The total number of patients with symptoms similar to WNF in 2022 in the territories of the south of European Russia amounted to 542 people, which is 2.8 times lower than the annual average (1,516 people). At the same time, in certain federal subjects of southern Russia (Stavropol Territory, Karachay-Cherkess Republic) in 2022, medical specialists did not actively identify WNF patients.

The high proportion of PCR-positive samples among *H. marginatum* ixodid ticks in the territory of the Astrakhan Region in our study and the data of scientific publications on WNV infestation of 2.6% of *H. marginatum* collected from cattle in the middle delta of the Volga River, as well as detection of WNV RNA in hungry imago collected in early spring, allow us to conclude about their significant participation in the epizootic process and preservation of the pathogen during the inter-epizootic period [16]. The role of this tick species in the epidemic process has not been studied, and this seems to be an actual direction of scientific research.

The high proportion of positive findings among mosquitoes of the genus *Aedes* indicates their important role not only in the course of the epizootic process of WNF, but also, possibly, in the infection of human WNV. However, to understand the epidemiological significance of mosquitoes of the *Aedes* genus or other genera, comprehensive studies are needed to investigate their vector competence, as well as the relationship between the dynamics of vector abundance and the morbidity of the population during the transmission season.

The detection of the Asian *Ae. koreicus* species in Adygea fits into the general trend of expansion of the range of this vector species observed in recent years in southern Russia. The presence of *Ae. koreicus* was established in 2013 and 2018 in Krasnodar Territory, in 2018 — in the Republic of Crimea [17, 18]. The vector competence of this species with respect to WNV in Russia has not been investigated.

Low detectability of WNV markers in the study of zoological and entomological material collected in cen-

tral Russia could probably be associated with a complex of factors affecting its volume and quality (unfavorable climatic conditions at the time of material collection, choice of biotopes, conditions of collection, storage and transportation of material, etc.). At the same time, the results of the examination of feverish patients presented above testify to the intensive circulation of WNV in the central part of Russia and contact of the population with it.

The lack of positive findings in field samples from Western Siberia is also due to the insufficient volume for the detection of WNV markers, which averaged 33 samples from one subject. In 2021, with a significantly larger volume of material examined (135 samples from the Omsk Region), WNV RNA was detected in 1 sample of *Coq. richiardii* mosquitoes and 2 samples of *I. persulcatus* ticks. Data on the circulation of WNV in Western Siberia are limited to the Omsk, Novosibirsk, Tomsk regions, Krasnoyarsk and Altai Territories [19, 20]. For an objective assessment of the WNF situation in Western Siberia, it is necessary to conduct targeted studies that will provide up-to-date information on the fauna of potential participants in the enzootic cycle of WNV and the activity of WNF foci in these territories.

As a result of the study of pathogenicity of WNV strains isolated in 2022, when infecting white mice with them, the majority of mice showed an increase in the incubation period of the disease and a decrease

in lethality compared to the data obtained for strains isolated in other years. Strains from the Astrakhan Region and Stavropol Territory were an exception, being highly virulent for laboratory animals and characterized by a lethality rate of 57%. Similar studies conducted with strains isolated in Australia, the USA, Canada, and Europe also noted the fact of circulation of WNV strains that differed significantly in virulence and neuroinvasive properties [21, 22].

The heterogeneity of WNV strains in terms of pathogenicity is due to their genetic diversity and is a consequence of adaptation to the change of hosts and vectors in the enzootic cycle, in which the virus replicates in cells of evolutionarily distant species.

Conclusions

1. In the course of comprehensive monitoring studies, a new northern border of the WNF range was established, which as of 2022 passes through the territory of the Tver region.

2. Data from seroepidemiological studies, including the detection of low-avidity IgG antibodies, confirm fairly intense, but undiagnosed contact of the population of the European part of Russia with the WNF pathogen.

3. In the southern region of the European part of Russia, WNV genotype 2 predominantly circulates, belonging to at least two clades formed in 2021 and 2022, respectively.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Онищенко Г.Г., ред. *Сборник материалов по вспышке лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2010 году*. Волгоград; 2011. Onishchenko G.G., ed. *Collection of Materials on the Outbreak of West Nile Fever in the Russian Federation in 2010*. Volgograd; 2011. EDN: <https://elibrary.ru/zcvbxc>
2. Городин В.Н., Нежурин А.В., Жукова Л.И. Современные аспекты лихорадки Западного Нила. *Инфекционные болезни*. 2023;21(1):140–7. Gorodin V.N., Nezhurin A.V., Zhukova L.I. Current aspects of West Nile fever. *Infect. Dis.* 2023;21(1):140–7. DOI: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2023-1-140-147>
3. Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Никитин Д.Н. и др. Лихорадка Западного Нила: результаты мониторинга за возбудителем в 2021 г. в Российской Федерации, прогноз заболеваемости на 2022 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(1):43–53. Putintseva E.V., Udovichenko S.K., Nikitin D.N., et al. West Nile fever: results of monitoring over the causative agent in the Russian Federation in 2021, the incidence forecast for 2022. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(1):43–53. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-43-53>
4. Батурин А.А., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л. и др. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):308–18. Baturin A.A., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., et al. Molecular genetic analysis of west Nile virus variants circulating in European Russia between 2010 and 2019. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):308–18. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-85> EDN: <https://elibrary.ru/mkwcdk>
5. Кононова Ю.В., Терновой В.А., Щелканов М.Ю. и др. Генотипирование вируса Западного Нила в популяциях диких птиц наземного и древесно-кустарникового комплексов на территории Барабинской лесостепи и Кулундинской степи (2003–2004 гг.). *Вопросы вирусологии*. 2006;51(4):19–23. Kononova Yu.V., Ternovoy V.A., Shchelkanov M.Yu., et al. West Nile virus Geno-typing among wild birds belonging to ground and tree-brush bird populations on the territories of the Baraba forest-steppe and Kulunda steppe (2003–2004). *Problems of Virology*. 2006;51(4):19–23. EDN: <https://elibrary.ru/gzqeuu>
6. Терновой В.А., Протопопова Е.В., Сурмач С.Г. и др. Генотипирование вируса Западного Нила, выявленного у птиц на юге Приморского края в течение 2003–2004 гг. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2006;(4):30–5. Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Surmach S.G., et al. Genotyping of the West Nile virus detected in birds in the south of Primorsky Krai during 2003–2004. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2006;(4):30–5. EDN: <https://elibrary.ru/hvtrgt>
7. Платонов А.Е., Карань Л.С., Шопенская Т.А., и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011;88(2):9–37. Platonov A.E., Karan' L.S., Shopenskaya T.A., et al. Genotyping of west Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;88(2):9–37. EDN: <https://elibrary.ru/rsyomj>
8. Colpitts T.M., ed. *West Nile Virus. Methods and Protocols*. New York; 2016.
9. Moser L.A., Ramirez-Carvajal L., Puri V., et al. A universal next-generation sequencing protocol to generate noninfectious barcoded cDNA libraries from high-containment RNA viruses. *mSystems*. 2016;1(3):e00039-15. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00039-15>.
10. Ходякова И.А., Смольянинов Д.И., Щукина И.А. и др. О результатах мониторинга за лихорадкой Западного Нила на территории Липецкой области. В кн.: Куличенко А.Н., ред. *Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. Ставрополь; 2019:80–2. Khodyakova I.A., Smolyaninov D.I., Shchukina I.A., et al. On the results of monitoring of West Nile fever in the Lipetsk region. In: Kulichenko A.N., ed. *Current Problems of Diseases Common to Humans and Animals: Materials of the III All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation*. Stavropol'; 2019:80–2.
11. Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Таран Т.В. и др. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Лихорадка Западного Нила. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(1):109–14. Maletskaya O.V., Prislegina D.A., Taran T.V., et al. Natural Focal Viral Fevers in the South of European Part of Russia. West Nile Fever. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(1):109–14. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-109-114> EDN: <https://elibrary.ru/ojjaet>
12. Гусев Е.А., Герасимова А.Д., Мачнева А.Ю. и др. Характеристика патогенных свойств штаммов вируса Западного Нила, выделенных на территории европейской части России в 2018–2021 годах. В кн.: *Актуальные вопросы профилактической медицины и санитарно-эпидемиологического благополучия населения: факторы, технологии, управление и оценка рисков. Сборник научных трудов. Специальный выпуск: по материалам межрегиональной научно-практической конференции*. Нижний Новгород; 2022:349–52. Gusev E.A., Gerasimova A.D., Machneva A.Yu., et al. Characteristics of pathogenic properties of West Nile virus strains isolated in the European part of Russia in 2018–2021. In: *Topical Issues of Preventive Medicine and Sanitary and Epidemiological Welfare of the Population: Factors, Technologies, Management and Risk Assessment. Collection of Scientific Papers. Special Issue: Based on the Materials of the Interregional Scientific and Practical Conference*. Nizhniy Novgorod; 2022:349–52. EDN: <https://elibrary.ru/qyibeo>
13. Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Шакарян А.К. и др. Лихорадка Западного Нила на территории Московской агломерации. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021;10(4):13–21. Klimova E.A., Karetkina G.N., Shakaryan A.K., et al. West Nile fever on the territory of the Moscow agglomeration. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2021;10(4):13–21. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-13-21> EDN: <https://elibrary.ru/ilxgax>
14. Козлова А.А., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф. и др. Изучение ареала вируса Западного Нила на территории европейской части России; результаты сероэпидемиологических исследований. Сообщение 2: Центральный, Приволжский и Северо-Западный федеральные округа. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017;22(2):52–7. Kozlova A.A., Butenko A.M., Larichev V.F., et al. The study of the area of distribution of west Nile virus in the territory of the European part of Russia; the results of seroepidemiological research. Report 1: Astrakhan region, Krasnodar region, Stavropol region, Saratov region. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2017;22(2):52–7. DOI: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-2-52-57> EDN: <https://elibrary.ru/ykuwjj>
15. Бутенко А.М., Козлова А.А., Ларичев В.Ф. и др. Лихорадка Западного Нила в Тульской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014;19(2):20–5. Butenko A.M.,

- Kozlova A.A., Larichev V.F., et al. West Nile fever in the Tula region, Russian Federation. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2014;19(2):20–5. EDN: <https://elibrary.ru/sdfmfb>
16. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкуллов К.Б. и др. Особенности циркуляции вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтов (2000–2002). *Вопросы вирусологии*. 2004;49(3):45–51. L'vov D.K., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., et al. The specificity of circulation of west Nile virus (Flaviviridae, Flavivirus) and of some other arboviruses in the ecosystems of Volga delta, Volga-Akhtuba flood-lands and adjoining arid regions (2000–2002). *Problems of Virology*. 2004;49(3):45–51. EDN: <https://elibrary.ru/oiwqlx>
17. Коваленко И.С., Тихонов С.Н. Обнаружение *Aedes Koreicus* (Edwards, 1917) (Diptera, Culicidae) на территории Крымского полуострова. *Паразитология*. 2019;53(2):129–35. Kovalenko I.S., Tikhonov S.N. Recording of *Aedes Koreicus* (Edwards, 1917) (Diptera, Culicidae) in the territory of Crimea. *Parasitology*. 2019;53(2):129–35. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0031184719020042> EDN: <https://elibrary.ru/xcjnnf>
18. Федорова М.В., Швеиц О.Г., Патраман И.В. и др. Завозные виды комаров на Черноморском побережье Кавказа: современные ареалы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2019;(1):48–55. Fedorova M.V., Shvets O.G., Patraman I.V., et al. Invasive mosquito species of the Black sea coast of the Caucasus: current ranges. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 2019;(1):47–55. DOI: <https://doi.org/10.33092/0025-8326mp2019.1.47-55> EDN: <https://elibrary.ru/xlppdy>
19. Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Терновой В.А. и др. Обнаружение вируса Западного Нила и его генетическое типирование у иксодовых клещей (Parasitiformes: Ixodidae) в городе Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2008;42(3):210–25. Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ternovoy V.A., et al. Detection of the West Nile virus and its genetic typing in ixodid ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Tomsk city and its suburbs. *Parasitology*. 2008;42(3):210–25. EDN: <https://elibrary.ru/jxfkmz>
20. Якименко В.В., Рудакова С.А., Василенко А.Г. *Лихорадка Западного Нила в Западной Сибири: информационное письмо*. Омск;2020. Yakimenko V.V., Rudakova S.A., Vasilenko A.G. *West Nile fever in Western Siberia: an Information Letter*. Omsk;2020. EDN: <https://elibrary.ru/eqcghz>
21. Saiz J.C., Martín-Acebes M.A., Blázquez A.B., et al. Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation. *Virulence*. 2021;12(1):1145–73. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1908740>
22. Schwartz G., Farnoushi Y., Berkowitz A., et al. Molecular characterization of the re-emerging West Nile virus in avian species and equids in Israel, 2018, and pathological description of the disease. *Parasit. Vectors*. 2020;13(1):528. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04399-2>

Information about the authors

Andrey V. Toporkov — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Director, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

Elena V. Putintseva — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9368-6165>

Svetlana K. Udovichenko[✉] — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Research Institute for Plague Control, vari2@sprint-v.com.ru, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8682-1536>

Natalya V. Boroday — senior researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2076-5276>

Elena V. Molchanova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of arbovirus infections, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3722-8159>

Olga S. Bondareva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of genodiagnostics particularly dangerous infections, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Aleksander S. Antonov — researcher, Laboratory of bioinformatics analysis, Volgograd Research Institute for Plague Control, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9342-7211>

Author contribution: *Toporkov A.V.* — the concept and design of the study; *Putintseva E.V.*, *Udovichenko S.K.* — concept and design of the study, data collection and processing, organizing the collection of clinical material, writing the text of the manuscript, interaction with the institutions of Rospotrebnadzor; *Boroday N.V.* — collection of field material, data processing; *Molchanova E.V.* — conducting virological research, writing the text of the manuscript; *Bondareva O.S.* — conducting molecular genetic research, writing the text of the manuscript; *Antonov A.S.* — carrying out full genome sequencing, writing the text of the manuscript. All authors made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 14.11.2023;
accepted for publication 28.12.2023;
published 28.02.2024

Информация об авторах

Топорков Андрей Владимирович — д.м.н., доцент, директор Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

Путинцева Елена Викторовна — к.м.н., в.н.с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9368-6165>

Удовиченко Светлана Константиновна[✉] — к.м.н., в.н.с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, vari2@sprint-v.com.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8682-1536>

Бородай Наталья Владимировна — с.н.с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2076-5276>

Молчанова Елена Владимировна — к.б.н., с.н.с. лаб. арбовирусных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3722-8159>

Бондарева Ольга Сергеевна — к.м.н., с.н.с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Антонов Александр Сергеевич — н.с. лаборатории биоинформационного анализа Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9342-7211>

Участие авторов: *Топорков А.В.* — концепция и дизайн исследования; *Путинцева Е.В.*, *Удовиченко С.К.* — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, организация сбора клинического материала, взаимодействие с учреждениями Роспотребнадзора, написание текста рукописи; *Бородай Н.В.* — сбор полевого материала, обработка данных; *Молчанова Е.В.* — проведение вирусологических исследований, написание текста рукописи; *Бондарева О.С.* — проведение молекулярно-генетических исследований, написание текста рукописи; *Антонов А.С.* — проведение полногеномного секвенирования, написание текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 14.11.2023;
принята к публикации 28.12.2023;
опубликована 28.02.2024



Нанокompозиты, состоящие из наночастиц диоксида титана, антисмысловых олигонуклеотидов и фотоактивируемых групп, как агенты для эффективного воздействия на нуклеиновые кислоты

Левина А.С.¹, Репкова М.Н.¹, Мазурков О.Ю.², Макаревич Е.В.²,
Мазуркова Н.А.², Зарытова В.Ф.^{1✉}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия;

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

Аннотация

Актуальность. Исследования на модельных системах подтвердили эффективность антисмысловых олигонуклеотидов, в том числе содержащих фотоактивируемые группы, для модификации нуклеиновых кислот (НК), однако эта стратегия пока не нашла широкого применения из-за отсутствия успешных методов доставки в клетки. Создание эффективных препаратов, способных воздействовать на НК-мишени в клетках, является актуальной задачей.

Цель работы — создание нанокompозитов, состоящих из наночастиц TiO₂, олигонуклеотидов и фотоактивируемых групп, и исследование их воздействия на НК-мишени на примере ингибирования репликации вируса гриппа А в клеточной системе.

Материалы и методы. В работе использовали вирус гриппа A/Aichi/2/68 (A/H3N2), N-сукцинимидный эфир п-азидотетрафторбензойной кислоты, TiO₂-наночастицы (анатаз) и олигодезоксирибонуклеотиды. Противовирусную активность созданных нанокompозитов исследовали на клетках MDCK, заражённых вирусом A/H3N2.

Результаты и обсуждение. Созданы уникальные нанокompозиты, состоящие из трех функциональных компонентов: наночастиц TiO₂, олигонуклеотидов и фотоактивируемой тетрафторарилазидогруппы, обеспечивающих, соответственно, проникновение в клетки, селективное взаимодействие с НК-мишенями и фотомодификацию этих мишеней. Продемонстрирован значительный противовирусный сайт-специфический эффект предложенных нанокompозитов в отношении вируса гриппа А в клеточной системе, который превышает эффект аналогичных препаратов, не содержащих фотоактивируемую группировку.

Заключение. Продемонстрирована биологическая активность созданных нанокompозитов на примере высокоэффективного подавления репликации вируса гриппа А в клеточной системе. Полученные результаты указывают на перспективность использования предложенных препаратов для воздействия на НК-мишени внутри клеток.

Ключевые слова: TiO₂-наночастицы, нанокompозиты, олигонуклеотиды, фотоактивируемые группы, противовирусная активность

Источник финансирования. Базовое бюджетное финансирование ИХБФМ СО РАН в рамках Программы фундаментальных научных исследований РФ № 121031300042-1 и финансирование Государственного задания ГНЦ ВБ «Вектор» № 30/21.

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

Для цитирования: Левина А.С., Репкова М.Н., Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Мазуркова Н.А., Зарытова В.Ф. Нанокompозиты, состоящие из наночастиц диоксида титана, антисмысловых олигонуклеотидов и фотоактивируемых групп, как агенты для эффективного воздействия на нуклеиновые кислоты. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):127–132.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-456>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-456>

Nanocomposites consisting of titanium dioxide nanoparticles, antisense oligonucleotides, and photoactive groups as agents for effective action on nucleic acids

Asya S. Levina¹, Marina N. Repkova¹, Oleg Yu. Mazurkov², Elena V. Makarevich², Natalya A. Mazurkova², Valentina F. Zarytova^{1✉}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia;

²State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Abstract

Relevance. Studies on model systems have confirmed the effectiveness of antisense oligonucleotides, including those that contain photoactive groups, for the modification of nucleic acids. However, this strategy has not yet found wide application due to the lack of successful methods for the cellular delivery. The development of effective preparations capable of acting on target nucleic acids in cells is an urgent task.

The objective of the work is to create nanocomposites consisting of TiO₂ nanoparticles, antisense oligonucleotides, and photoactive groups and to study their effect on target nucleic acids by the example of inhibition of influenza A virus replication in the cellular system.

Materials and methods. Influenza virus A/Aichi/2/68 (A/H3N2), N-succinimide ether of *p*-azidotetrafluorobenzoic acid, TiO₂ nanoparticles, and oligodeoxyribonucleotides have been used in the work. The antiviral activity of the proposed nanocomposites has been studied on the MDCK cells infected with the A/H3N2 virus.

Results and discussion. Unique nanocomposites have been created, which consist of three functional components, i.e., titanium dioxide nanoparticles, antisense oligonucleotides, and the photoactive tetrafluoroarylazide group, respectively, providing penetration into cells, selective interaction with target nucleic acids, and photomodification of the targets. A significant antiviral site-specific action of the nanocomposites has been demonstrated against the influenza A virus in the cellular system, which exceeds the effect of the analogous samples that contain no photoactive groups.

Conclusion. The biological activity of the created nanocomposites has been demonstrated by the example of highly effective suppression of influenza A virus replication in the cellular system. The results indicate the prospects of using the proposed drugs to affect target nucleic acids inside cells.

Keywords: TiO₂ nanoparticles, nanocomposites, oligonucleotides, photoactive groups, antiviral activity

Funding source. Basic budget financing of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Program of Fundamental Scientific Research of RF No. 121031300042-1 and State assignment of the State Scientific Center for State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" No. 30/21.

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

For citation: Levina A.S., Repkova M.N., Mazurkov O.Yu., Makarevich E.V., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. Nanocomposites consisting of titanium dioxide nanoparticles, oligonucleotides, and photoactive groups as agents for effective action on nucleic acids. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):127–132.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-456>

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

Введение

Реакционноспособные производные олигонуклеотидов (ОН) широко используются для сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот (НК). Этот подход, впервые предложенный Н.И. Гриневой и соавт. [1], основан на сохранении способности ОН, несущих химически активные группы, образовывать комплементарные комплексы с НК-мишенью, что обеспечивает её направленную модификацию. ОН играет роль адреса, обеспечивающего комплементарное связывание с фрагментом целевой НК. Реактивная группа модифицирует этот

фрагмент и блокирует функцию НК. В последние годы эта стратегия, так называемый антисмысловый подход, получила широкое признание.

Для воздействия на НК широко используются производные ОН, содержащие различные фотоактивируемые группы. Эти группы стабильны в физиологических условиях и инертны в темноте и реагируют только при облучении, поэтому можно инициировать реакцию в любой момент и легко контролировать процесс модификации. Ароматические азиды представляют особый интерес, поскольку они обладают высоким квантовым выходом, т.е.

не требуют высокой интенсивности и длительного времени экспозиции для активации. Ранее показано, что производные ON, несущие перфторарилазидную группу, оказались высокоэффективными реагентами для модификации НК [2, 3].

Исследования на различных модельных системах подтвердили эффективность ON для модификации НК, однако эта стратегия пока не нашла широкого применения. Основным препятствием является отсутствие эффективных методов доставки ON и их реакционноспособных производных в клетки. Для этой цели часто используются неорганические наночастицы различной природы [4, 5]. Известно, что наночастицы оксида титана (TiO_2) проникают в клетки [6]. В наших предыдущих работах показано, что ON-содержащие нанокompозиты на основе наночастиц TiO_2 способны проникать через клеточную мембрану [7, 8]. В работах [9–11] продемонстрирован противовирусный эффект нанокompозитов на основе наночастиц TiO_2 , несущих нативные олигодезоксирибонуклеотиды, в отношении вируса гриппа А.

Целью данной работы было создание нанокompозитов, состоящих из наночастиц TiO_2 и ON с фотоактивируемыми группами, и исследование их воздействия на НК-мишени на примере ингибирования репликации вируса гриппа А в клеточной системе.

Материалы и методы

В работе использовали клетки MDCK, вирус гриппа A/Aichi/2/68 (A/H3N2) (ГНЦ ВБ «Вектор»); ON, синтезированные на ДНК-синтезаторе «ASM-800» («Biosset»). N-сукцинимидный эфир п-азидотетрафторбензойной кислоты ($\text{ArN}_3\text{-SuIm}$) получен по методу [12].

Наночастицы TiO_2 в кристаллической форме анатаза получали гидролизом изопропоксида титана $\text{Ti}(\text{O-iPr})_4$ [7, 8].

Нанокompозиты первого типа $\text{TiO}_2/\text{PL-ON}$ с ковалентной связью между ON и полилизинном (PL) получали с практически количественным выходом [8] при смешивании заранее полученного конъюгата PL-ON с наночастицами анатаза. Нанокompозиты второго типа $\text{TiO}_2/\text{PL}\bullet\text{ON}$ с ионной связью между ON и PL получали при смешивании ON с TiO_2 -наночастицами с заранее иммобилизованным PL с ёмкостью по аминок группам PL 1 мкмоль/мг [8]. Выход при получении обоих типов нанокompозитов был практически количественный; ёмкость по ON — 20 нмоль/мг.

Все манипуляции с наночастицами и нанокompозитами проводили после обработки ультразвуком в течение 30 с в ультразвуковой ванне («Сапфир»). Характеристика нанокompозитов проведена с использованием физико-химических методов (просвечивающая электронная микроскопия высокого раз-

решения, сканирующая электронная микроскопия, малоугловое рентгеновское рассеяние) и описана ранее [7, 8]. Показано, что размер нанокompозитов был больше на ~1 нм размера исходных наночастиц (~5 нм), что указывало на образование комплексов между фрагментами ДНК и наночастицами. Соотношение фосфата и титана (P/Ti) в нанокompозитах показало хорошую корреляцию между расчётными и экспериментальными данными. Используя радиоактивно и флуоресцентно меченные ON, мы подтвердили их прикрепление к наночастицам и показали, что ON в обоих типах нанокompозитов сохранили свою способность образовывать комплементарные комплексы и могут проникать в эукариотические клетки [7, 8, 11].

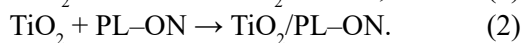
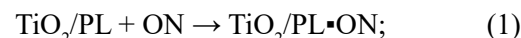
Введение фотоактивируемой арилазидной группы в ON проводили по методу [2] при обработке ON, содержащего концевую аминокгруппу, с помощью $\text{ArN}_3\text{-SuIm}$ и получали ON^* , содержащий арилазидную группу, который использовали для получения нанокompозитов $\text{TiO}_2/\text{PL}\bullet\text{ON}^*$. Нанокompозиты $\text{TiO}_2/\text{PL}^*\text{-ON}$ получали при обработке нанокompозитов $\text{TiO}_2/\text{PL-ON}$ с помощью $\text{ArN}_3\text{-SuIm}$ [13].

Противовирусную активность созданных нанокompозитов исследовали на клетках MDCK, заражённых вирусом A/H3N2 [13]. Заражённые вирусом клетки MDCK, не обработанные нанокompозитами, использовали в качестве контроля.

УФ-облучение заражённых клеток MDCK проводили в процессе инкубации с нанокompозитами лампой «PL-S 9W/10» (350–400 нм, 10 мВ/см², дистанция 1 см; «Philips»).

Результаты и обсуждение

Для создания нанокompозитов использовали две стратегии [8]. Первый метод (1) состоит в электростатическом связывании ON с предварительно подготовленными наночастицами, покрытыми PL (TiO_2/PL). Второй метод (2) состоит в иммобилизации PL-содержащих олигодезоксирибонуклеотидов (PL-ON) на TiO_2 -наночастицах.



Для получения фотоактивируемых нанокompозитов в первом случае на наночастицах TiO_2/PL иммобилизовали ON с предварительно введённой фотоактивируемой арилазидной группой [2] и получали нанокompозиты $\text{TiO}_2/\text{PL}\bullet\text{ON}^*$. Во втором случае перфторарилазидную группу присоединяли к аминокгруппам PL в сформированном нанокompозите и получали $\text{TiO}_2/\text{PL}^*\text{-ON}$. Таким образом, получены два типа нанокompозитов: с ионной (\bullet) или ковалентной ($-$) связью между ON и PL, причём фотоактивируемая группа введена либо в ON в первом случае, либо в остаток PL во втором случае.

В качестве ОН в нанокompозитах использовали 21-мерный олигодезоксирибонуклеотид 5'-GCAAAAGCAGGGTAGATAATCp (ODN), комплементарный 3'-концевой области (-)РНК 5-го сегмента вируса гриппа А, кодирующего белок NP, и 5'-GATCAACTCCATATGCCATGTp (SCR) со случайной последовательностью в качестве контроля.

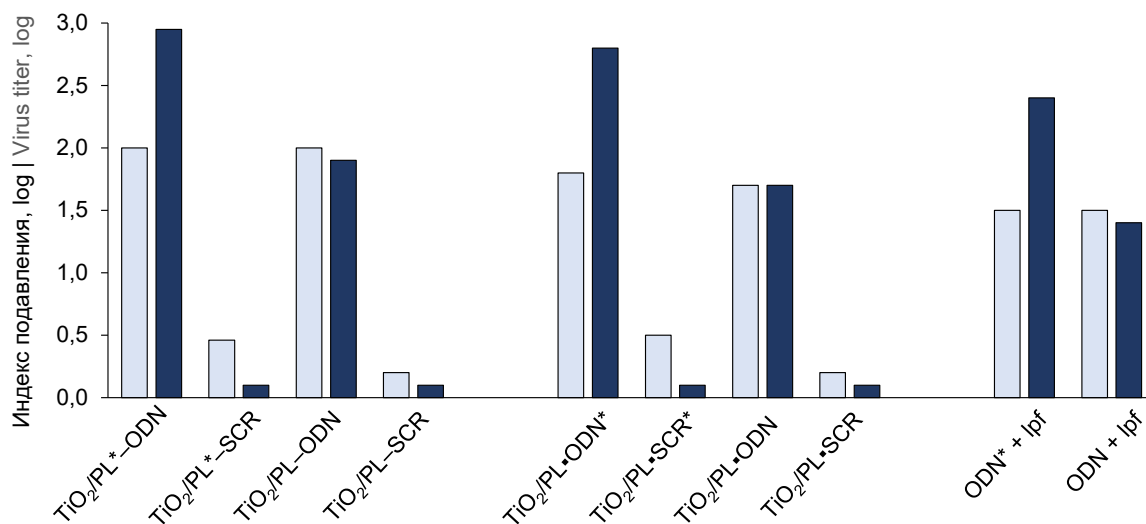
В исследованиях противовирусной активности на клетках MDCK, заражённых вирусом А/Н3N2, использовали нанокompозиты в нетоксичной для клеток концентрации 100 мкг/мл. Ингибирование вируса в клетках MDCK выражали в виде логарифма индекса подавления продукции (ИПП) вируса. Значение log ИПП равняется разности логарифмов титра вируса в клетках в отсутствие (контроль) и в присутствии образцов. Таким образом, log ИПП означает, на сколько порядков происходит ингибирование вируса; чем выше log ИПП, тем более эффективно действует исследуемый препарат.

Прежде всего, следует отметить, что нанокompозиты обладают сайт-специфическим действием, т.е. «комплементарные» нанокompозиты, несущие ODN, комплементарный вирусной РНК, проявляют существенно большую активность по сравнению с «некомплементарными» нанокompозитами, несущими случайную последовательность SCR (**рисунок**). Разница составляет 1,5–2,0 порядка до облучения, после облучения этот эффект выражен даже в большей степени.

ODN* проявляет примерно на порядок большую активность после облучения независимо от того, в составе какого нанокompозита он доставлен в клетки (рисунок). Как и следовало ожидать, «комплементарные» нанокompозиты, не содержащие фотоактивируемую группу, не отличаются по своей активности до и после облучения. Противовирусная активность комплементарных ODN почти не зависит от наличия фотоактивируемой группы в составе нанокompозита, если они не подвергаются облучению. Положение фотоактивируемой группы в нанокompозите (на остатке полилизина или в ODN) практически не влияет на противовирусный эффект.

Интересно отметить, что «некомплементарные» нанокompозиты, несущие фотоактивируемую группу, менее активны после облучения (рисунок). Возможно, этот эффект вызван автодеструкцией SCR при облучении в том случае, если он не находится во взаимодействии с комплементарной мишенью, что приводит к снижению противовирусной активности.

Как и в случае, когда ODN находится в составе нанокompозитов, не связанных с наночастицами ODN, доставленный в клетки с помощью липофектамина (широко используемого трансфекционного агента), проявляет большую активность после облучения, если он содержит арилизидную группу, а активность немеченого ODN не зависит от облучения (рисунок). Во всех случаях ODN в составе нанокompозитов проявляет несколько большую



Противовирусная активность образцов нанокompозитов на основе наночастиц TiO₂, содержащих комплементарный (ODN) и некомплементарный (SCR) ОН по отношению к вирусной РНК, а также содержащих или не содержащих фотоактивируемую арилизидную группу на остатке полилизина или ОН (соответственно PL*, ODN*, SCR* и PL, ODN, SCR).

Светлые столбики — до ультрафиолетового облучения культуры зараженных клеток с образцами, темные — после. lpf — липофектамин.

Antiviral activity of samples expressed as the logarithm of the virus production suppression index. TiO₂-based nanocomposites contained complementary and non-complementary oligonucleotides to viral RNA (ODN and SCR, respectively); they contained the photoactive arylazide group on the polylysine residue or oligonucleotide (PL*, ODN*, or SCR*) or did not contain this group.

The light and dark columns correspond to the results before and after UV irradiation of infected cell cultures with samples, respectively; lpf, lipofectamine.

противовирусную активность по сравнению с тем, когда он доставлен в клетки в присутствии липофектамина.

Заключение

Таким образом, созданы уникальные наноконструкты, состоящие из трех функциональных компонентов: наночастиц TiO_2 , антисмыслового ODN и фотоактивируемой тетрафторарилазидогруппы, обеспечивающих, соответственно, проникновение в клетки, селективное взаимодействие с НК-мишенями и фотомодификацию этих мишеней. Продемонстрирован значительный противовирусный сайт-специфический эффект предложенных наноконструктов для воздействия на НК-мишени на примере ингибирования репликации вируса гриппа А в клеточной системе. Показано, что наноконструкты, содержащие фотоактивируемую группу, более эффективны по сравнению с немодифицированными аналогами. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования предложенных препаратов для воздействия на НК-мишени внутри клеток.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett.* 1967;37:3557–62.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)89794-x](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)89794-x)
2. Levina A.S., Berezovskii M.V., Venjaminova A.G., et al. Photomodification of RNA and DNA fragments by oligonucleotide reagents bearing arylazide groups. *Biochemie.* 1993;75(1-2): 25–7. DOI: [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90020-s](https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90020-s)
3. Levina A.S., Tabatadze D.R., Dobrikov M.I., et al. Site-specific photomodification of single-stranded DNA targets by arylazide and perfluoroarylazide derivatives of oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acids Drug Dev.* 1996;6(2):119–26.
DOI: <https://doi.org/10.1089/oli.1.1996.6.119>
4. Kim T.H., Kim M., Eltohamy M., et al. Efficacy of mesoporous silica nanoparticles in delivering BMP-2 plasmid DNA for in vitro osteogenic stimulation of mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2013;101(6):1651–60.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34466>

Информация об авторах

Левина Ася Сауловна — к.х.н., с.н.с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

Репкова Марина Николаевна — к.х.н., н.с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

Мазурков Олег Юрьевич — к.б.н., н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Макаревич Елена Викторовна — н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

5. Kovtun A., Neumann S., Neumeier M., et al. Nanoparticle-mediated gene transfer from electrophoretically coated metal surfaces. *J. Phys. Chem. B.* 2013;117(6):1550–5.
DOI: <https://doi.org/10.1021/jp303448v>
6. Thurn K.T., Arora H., Paunesku T., et al. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine.* 2011;7(2):123–30.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.09.004>
7. Levina A., Ismagilov Z., Repkova M., et al. Nanocomposites consisting of titanium dioxide nanoparticles and oligonucleotides. *J. Nanosci. Nanotech.* 2012;12(3):1812–20.
DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5190>
8. Левина А.С., Исмагилов З.Р., Репкова М.Н. и др. Создание TiO_2 -DNA-наноконструктов, способных проникать в клетки. *Биоорганическая химия.* 2013;39(1):87–98. Levina A.S., Repkova M.N., Shatskaya N.V., et al. Design of TiO_2 -DNA nanocomposites for penetration into cells. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2013;39(1):77–86.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S1068162013010068>
EDN: <https://elibrary.ru/reypqd>
9. Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., et al. High antiviral effect of TiO_2 :PL-DNA nanocomposites targeted to conservative regions of (–)RNA and (+)RNA of influenza A virus in cell culture. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016;7:1166–73.
DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.108>
10. Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., et al. High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO_2 -DNA nanocomposites. *Sci. Rep.* 2012;2:756.
DOI: <https://doi.org/10.1038/srep00756>
11. Levina A.S., Repkova M.N., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. Nanoparticle-mediated nonviral DNA delivery for effective inhibition of influenza A viruses in cells. *IEEE Trans. Nanotechnol.* 2016;15(2):248–54.
DOI: <https://doi.org/10.1109/TNANO.2016.2516561>
EDN: <https://elibrary.ru/wtfubh>
12. Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. Синтез и свойства светочувствительных капроновых мембран. Фотоиммобилизация ДНК. *Сибирский химический журнал.* 1992;(2):18–24. Dobrikov M.I., Prikhod'ko T.A., Safronov I.V., Shishkin G.V. Synthesis and properties of photosensitive nylon membranes. Photo immobilization of DNA. *Siberian Chemical Journal.* 1992;(2):18–24.
13. Зарытова В.Ф., Исмагилов З.Р., Левина А.С. и др. Наноконструкт с активным лигандом, способ его приготовления и способ адресной инактивации вируса гриппа внутри клетки. Патент РФ № 2496878;2012. Zarytova V.F., Ismagilov Z.R., Levina A.S., et al. A nanocomposite with an active ligand, a method for its preparation and a method for targeted inactivation of the influenza virus inside the cell. Patent RF № 2496878;2012.

Information about the authors

Asya S. Levina — Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

Marina N. Repkova — Cand. Sci. (Chem.), researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

Oleg Yu. Mazurkov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, SRC VB «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Elena V. Makarevich — researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, SRC VB «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

Мазуркова Наталья Алексеевна — д.б.н., в.н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Зарытова Валентина Филипповна[✉] — д.х.н., г.н.с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, zarytova@niboch.ncs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>

Участие авторов: *Левина А.С.* — введение фотоактивируемой группы в олигонуклеотиды и наноконпозиты, написание статьи; *Репкова М.Н.* — синтез олигонуклеотидов, их конъюгатов и наноконпозитов; *Мазурков О.Ю.* — УФ-облучение заражённых клеток в процессе их инкубации с наноконпозитами; *Макаревич Е.В.* — подготовка клеток и вируса для исследования противовирусной активности наноконпозитов; *Мазуркова Н.А.* — проведение экспериментов по исследованию противовирусной активности наноконпозитов; *Зарытова В.Ф.* — постановка задачи и обработка результатов экспериментов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.12.2023;
принята к публикации 19.02.2024;
опубликована 28.02.2024

Natalya A. Mazurkova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, SRC VB «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Valentina F. Zarytova[✉] — D. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, zarytova@niboch.ncs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>

Author contribution. *Levina A.S.* — introduction of a photoactivated group into oligonucleotides and nanocomposites, writing an article; *Repkova M.N.* — synthesis of oligonucleotides, their conjugates and nanocomposites; *Mazurkov O.Yu.* — UV irradiation of infected cells during their incubation with nanocomposites; *Makarevich E.V.* — preparation of cells and virus for the study of antiviral activity of nanocomposites; *Mazurkova N.A.* — studying the antiviral activity of nanocomposites; *Zarytova V.F.* — supervision. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 22.12.2023;
accepted for publication 19.02.2024;
published 28.02.2024



Dampening of proteomics activity associated with the COVID-19 patients afflicted with asthma based on gene expression pattern

Dawood Ali Adel[✉]

University of Mosul, Iraq

Abstract

Introduction. It is established that the severity of SARS-CoV-2 infections varies between individuals without underlying health conditions and those with chronic illnesses like asthma.

Aim: to assess the gene expression of COVID-19 patients with and without asthma.

Materials and Methods. 20 patient profiles out of a total of 288 were selected from Gene Expression Omnibus (GSE178399). All patients have positive PCR tests and were divided into 4 groups. GEO2R was used to estimate the comparison between groups. STRING tool was used to measure the correlation between genes. The phylogenetic tree was extracted using iTOL. The heat map was extracted using iDEP.96.

Results. MMP10 (Matrix metalloproteinase-10), TNFRSF11B (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B), CCL23 (C-C motif chemokine ligand 23), CD274 (Programmed cell death 1) CX3CL1 (C-X3-C motif chemokine), and IL17C (Interleukin-17C) had down-regulation for all patients. Transcriptome data conducted no correlation between the expression of MMP10 and asthma, although there is a significant correlation between the expression of MMP1 and sensitivity. The expression of IL17A, which is strongly related to allergic asthma, is decreased in non-asthmatic individuals but elevated in asthmatic patients, notably in survivors. Patients who were not asthmatic had significantly higher CXCL9 levels.

Conclusions. The study revealed a disparity in the relationship between imbalanced gene expressions in the groups examined. The gene expression of asthma patients who survived and died was not significantly different.

Keywords: SARS-CoV-2, gene expression, asthma, CXCL9, interleukin, down-regulation

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

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

For citation: Dawood A. Dampening of proteomics activity associated with the COVID-19 patients afflicted with asthma based on gene expression pattern. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2024;101(1):133–142.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-399>

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

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-399>

Подавление протеомной активности, связанной с пациентами с COVID-19, страдающими астмой, на основе паттерна экспрессии генов

Давуд Али А. [✉]

Университет Мосула, Ирак

Аннотация

Введение. Инфекция SARS-CoV-2 была связана с различными хроническими и иммунозависимыми заболеваниями, включая астму.

Цель исследования — оценка экспрессии генов у пациентов с COVID-19 с астмой или без нее.

Материалы и методы. 20 профилей пациентов из 288 были выбраны из Gene Expression Omnibus (GSE178399). Все пациенты имели положительные ПЦР-тесты и были разделены на 4 группы. GEO2R использовался для оценки сравнения между группами. Инструмент STRING применялся для измерения корреляции между генами. Филогенетическое дерево было извлечено с использованием iTOL. Тепловая

карта была построена с помощью iDEP.96.

Результаты. *MMP10* (матриксная металлопротеиназа-10), *TNFRSF11B* (представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 11В), *CCL23* (лиганд 23 хемокина мотива СС), *CD274* (запрограммированная гибель клеток 1), *CX3CL1* (хемокин мотива С-Х3-С) и *IL17C* (интерлейкин-17С) подавлял активность у всех пациентов. Данные транскриптома не выявили корреляции между экспрессией *MMP10* и астмой, хотя существует значительная корреляция между экспрессией *MMP1* и чувствительностью. Экспрессия *IL17A*, тесно связанная с аллергической астмой, снижена у лиц, не страдающих астмой, но повышена у больных астмой, особенно у выживших. У пациентов, не страдающих астмой, уровни *CXCL9* были значительно выше.

Выводы. Исследование выявило несоответствие во взаимосвязи между несбалансированной экспрессией генов в исследованных группах. Экспрессия генов у выживших и умерших пациентов с астмой существенно не различалась.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, экспрессия генов, астма, CXCL9, интерлейкин, снижение регуляции.

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Давуд Али А. Подавление протеомной активности, связанной с пациентами с COVID-19, страдающими астмой, на основе паттерна экспрессии генов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):133–142.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-399>

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

Introduction

Even though the occurrence of COVID-19 infections has decreased, this doesn't eliminate the possibility of new variants emerging [1]. The alterations that occurred in the virus were responsible for both the increase and decrease in fatalities. Vaccines also played a significant impact in the decrease of the epidemic [2, 3]. Medical conditions that had been related to a higher risk of hospitalization and death from COVID-19 infection have been found through epidemiological research [4]. Patients with underlying health issues, such as cardiovascular disease, hypertension, asthma, or advanced age, had a greater chance of dying. Current research into the molecular pathways triggered by SARS-CoV-2 infection is actively evaluating genomic and proteomic patterns [5].

The multi-organ inflammatory response that results from the patient's immune system reaction to COVID-19 is a substantial contributor to the disease's severity. Several types of research have hinted at the part played by circulating immune cells in pandemic severe respiratory syndrome [6, 7]. During the early phases of SARS-CoV-2 infection, the immune response primarily targets the spike glycoprotein. A cross-sectional study revealed that individuals with COVID-19 exhibited a decreased proportion of T-helper cells producing IFN γ . However, the actual impact of immune cell responses on infection outcomes hasn't been definitively confirmed through clinical results [8, 9].

It is well established that in response to a pathogen, immune cells release cytokines and immunological complexes. Thus, the over-secretion of these immu-

nological complexes onto normal cells of the body may expose the human to an immune setback [10, 11].

The significance of immunity complexes in COVID-19 patients could be better understood if the interplay of key immunological axes were studied, especially in individuals with specific chronic diseases like asthma. The severity of asthma and the ability to control asthma are two distinct but related aspects of each patient's condition [12]. Asthma exacerbations and deterioration in symptoms are linked to factors like resistance to therapy or the existence of risk factors such as viral respiratory infection. When respiratory infections or other diseases trigger asthma exacerbations, the patient's health deteriorates and their prognosis worsens [13].

The purpose of this research is to assess gene expression between COVID-19 asthma and non-asthmatic patients.

Materials and Methods

A pilot study was conducted to detect thousands of genes using microarrays in samples of 288 COVID-19 positive patients. Within this group, there was a subset of individuals who had asthma at varying degrees of severity. From this larger cohort, a specific subset of 20 cases was selected for further analysis. Among these cases, some individuals had unfortunately passed away due to severe asthma, which was characterized by an increased presence of Th2-cells. Another separate subset comprised individuals with asthma in a moderate state, who had managed to overcome both COVID-19 and asthma with relatively few complications. These distinct subgroups were then compared to individuals

who did not have asthma. This comparison included individuals who had died from COVID-19 as well as those who had successfully recovered from the disease. The experimental study was carried out to detect thousands of genes using microarray. Gene expression data from DNA microarray or other sources is the input. Key features include data pre-processing, data exploration, differential expression analysis, pathway analysis, and data visualization [14]. The information about the patients was retrieved and analyzed from the gene expression omnibus (GEO) with the ID (GSE178399) [15]. 20 patient profiles were chosen for the investigation, as shown in **Table 1**. The PCR tests for SARS-CoV-2 were positive for all patients. Patients were categorized into the following four groups: non-asthma patients survived, non-asthma patients deceased, asthma patients survived, and asthma patients deceased.

GEO2R was used to evaluate and estimate the comparison between groups. GEO2R is used to identify genes that express differently under different experimental settings. The results are summarized in a table that lists the top 92 genes, sorted according to their *P*-value. These genes have significantly the lowest *P*-value.

Ten genes out of a total of 92 were selected to be tested for expression across 20 selected samples. The online STRING tool was used to measure the correlation between genes. The phylogenetic tree for genes was extracted using iTOL and STRING servers. The heat map of the expressed genes was extracted using iDEP.96.

Results

The information regarding the expression of 92 genes for 20 samples was supplied in the supplementary file. This information included the adj. *P* value, the *P* value, and the spot Id. A volcano graphic visualizes differentially expressed genes by displaying statistical significance with $(-\log_{10} P \text{ value})$ vs the amount of change (\log_2 fold change). **Figure 1, a** depicts normal expression as black dot genes and down-regulation as blue dot genes. Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) is a technique for reducing the number of dimensions that is beneficial for visualizing how different samples are related to one another. Indicated within the plot is the total number of nearest neighbors that were factored into the calculation. The variance in gene expression was not significantly different across any of the patient groups (Fig. 1, *b*). The limma (Venn diagram) method is used to investigate and download the overlap in important genes between various comparisons. By selecting the relevant contrasts, the genes in each Venn diagram region can be downloaded. The study's findings show that no number of genes are linked to each other among the patient groups (Fig. 1, *c*). The box plot was used to disperse the values of the chosen samples. Colored samples were

Table 1. Profiles of COVID-19 patients, 0 = Non-asthma, 1 = Asthma

Sample	Accession no.	Age	Asthma	Outcome
1	GSM5389989	41	0	Survived
2	GSM5389990	38	0	=
3	GSM5389991	39	0	=
4	GSM5389992	63	0	=
5	GSM5389993	25	0	=
6	GSM5389998	59	0	Deceased
7	GSM5380013	63	1	Survived
8	GSM5380021	46	1	=
9	GSM5380024	65	1	=
10	GSM5380031	47	0	Deceased
11	GSM5380032	46	0	=
12	GSM5380049	82	1	=
13	GSM5380054	87	1	Survived
14	GSM5380059	57	1	Deceased
15	GSM5380063	54	1	Survived
16	GSM5380070	50	1	Deceased
17	GSM5380077	78	0	=
18	GSM5380083	66	0	=
19	GSM5380127	49	1	=
20	GSM5380273	58	1	=

distributed in groups. The distribution's width can be utilized to determine whether the selected samples are suitable for differential expression analysis. The values of the patient samples centered on the median indicate that the data are standardized and mutually comparable, implying that all of the selected samples have an equal value distribution. The graphic depicts the data after log transformation and normalization, Fig. 1, *d*.

plotDensities was utilized to estimate the distribution values of the selected samples based on the colored group. This plot complements the boxplot for data normalization verification before differential expression analysis. There is no difference in the distribution of density curves in the current investigation. The plot depicts the data after log transformation and normalization have been completed, as seen in **Fig. 2, a**. The limma (qqt) plot compares the quantiles of the dataset to the theoretical quantiles of the t-test distribution. This plot aids in evaluating the quality of the limma test results. The dots in Fig. 2, *b* are optimally aligned along a straight line, indicating that the values for the moderated t-statistic derived from the test conform to their theoretically predicted distribution. After a linear model has been fitted, the Vooma plot is used to assess the mean-variance relationship of expression data. This graphic can assist determine whether it is worthwhile to use precision weights to account for the trend of mean-variance. Each black dot in the data represents a gene, and the red line is an approximation

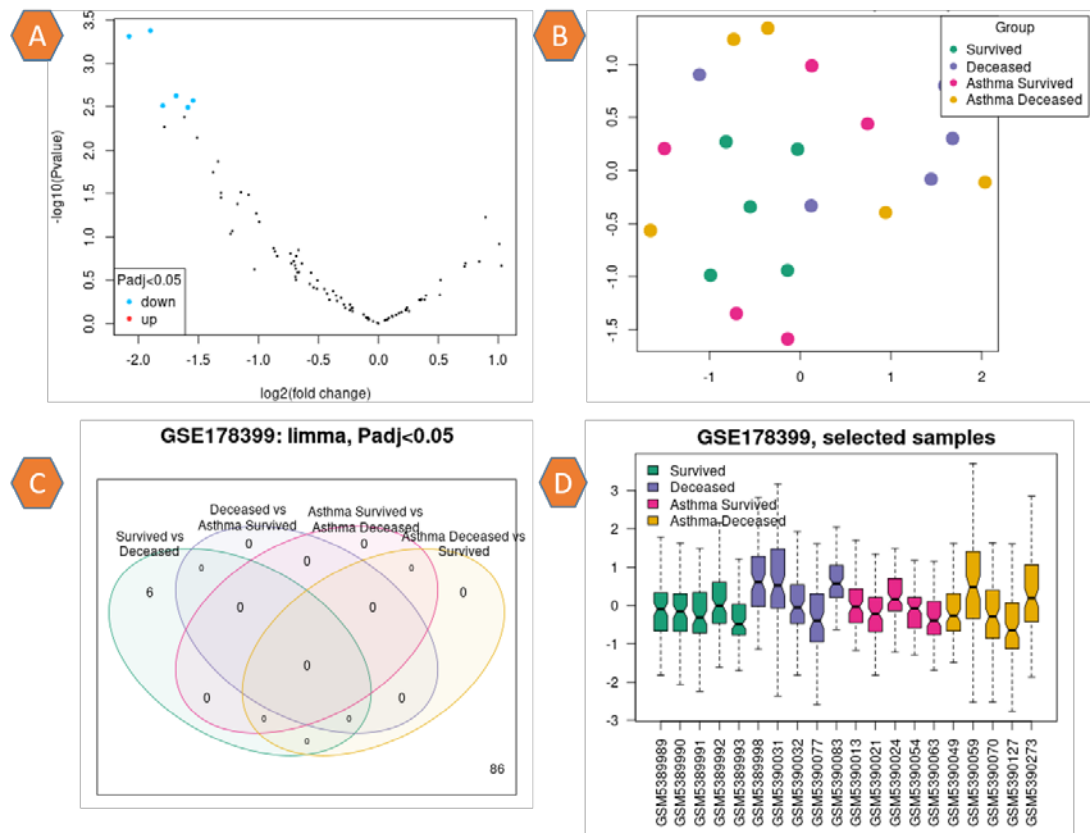


Fig. 1. a: Volcano plot: Prevalence of genes, black dots indicate normal gene expression, blue dots indicate down regulation. b: UMAP plot presents the distribution of sample related to their colors. c: Limma plot for the groups of patients represents without correlations between groups in P adj. value < 0.05 . D: Box plot of the patients' profile represents the standardized and mutually comparable.

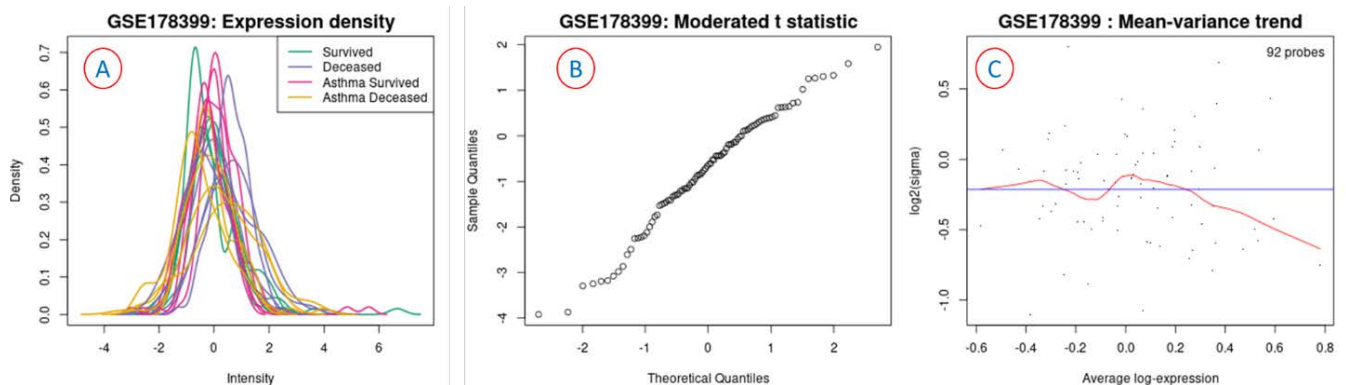


Fig. 2. a: plotDensities: Distribution of samples divided into four groups according to color. b: limma (qqt): Arrangement of dataset to the theoretical quantiles of the t-test distribution. c: Voorna plot: The mean correlation variance of the expression data.

of the variance direction that can be taken into account during differential gene expression analysis. The blue line depicts the continuous variation shown in the illustration in Fig. 2, c.

The heatmap of the expression genes for the selected samples is shown in Fig. 3. Changes in gene expression are shown by a scale ranging from -3 for down-regulation (green) to 3 for up-regulation (red).

As a result of the variation in gene expression between samples, ten genes were chosen to investigate the variation in gene expression that exists between the four patient groups, as shown in Fig. 4. The expression of ten genes and their accession numbers are listed in Table 2.

According to the criterion of $P < 0.05$, ten genes (*MMP10*, *TNFRSF11B*, *CCL23*, *CD274*, *CX3CL1*,

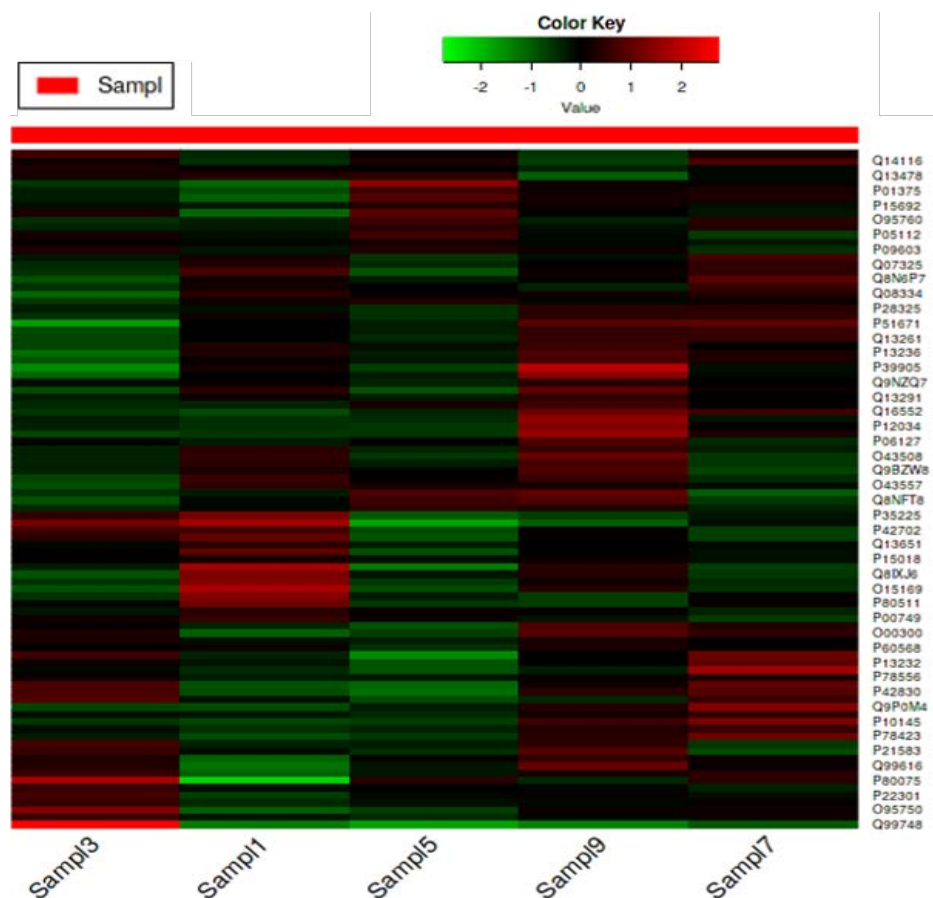


Fig. 3. Heatmap of the 20 samples gene expression. The scale of expression is between (–3 down-regulation to 3 up-regulation).

IL17C, *MMP1*, *IL10*, *CXCL9*, and *IL17A*) were identified as being associated with an increased risk and warranting further investigation. Heat maps illustrating the relationship between these shared genes based on sample expression revealed that a large proportion of the genes with down-regulated expression were shared (**Fig. 5**). The type and strength of the relationship between the

10 immune genes are depicted in **Fig. 6, a**. Seven of ten genes were shown to have a distinct cumulative association after clustering, as shown in **Fig. 6, b**. Proteins whose gene expression is associated across a wide range of tests. **Figure 7** illustrates coexpression scores based on protein co-regulation and RNA expression patterns. Proteins that coexpress the 10 genes under study are as-

Table 2. Expression selected genes and their IDs

ID	Adj. P. Val	P. Value	Frequency	Common name of gene	Node degree	Expression
P09238	0.0804	0.000874	7.0282	<i>MMP10</i> (Matrix metalloproteinase-10)	2	Down Regulation
O00300	0.1472	0.003633	5.47	<i>TNFRSF11B</i> (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B)	3	Down-Regulation
P55773	0.1472	0.005515	5.036	<i>CCL23</i> (C-C motif chemokine ligand 23)	3	Down-Regulation
Q9NZQ7	0.1472	0.006401	4.8835	<i>CD274</i> (Programmed cell death 1)	3	Down-Regulation
P78423	0.2214	0.016846	3.9207	<i>CX3CL1</i> (C-X3-C motif chemokine)	4	Down-Regulation
Q9P0M4	0.2462	0.024484	3.5608	<i>IL17C</i> (Interleukin-17C)	1	Down-Regulation
P03956	0.4652	0.157531	1.8485	<i>MMP1</i> (Matrix metalloproteinase-1)	4	Normal
P22301	0.3639	0.090973	2.3426	<i>IL10</i> (Interleukin-10)	9	Normal
Q07325	0.3014	0.066121	2.6331	<i>CXCL9</i> (C-X-C motif chemokine 9)	5	Normal
Q16552	0.6217	0.405465	0.999	<i>IL17A</i> (Interleukin-17A)	6	Normal

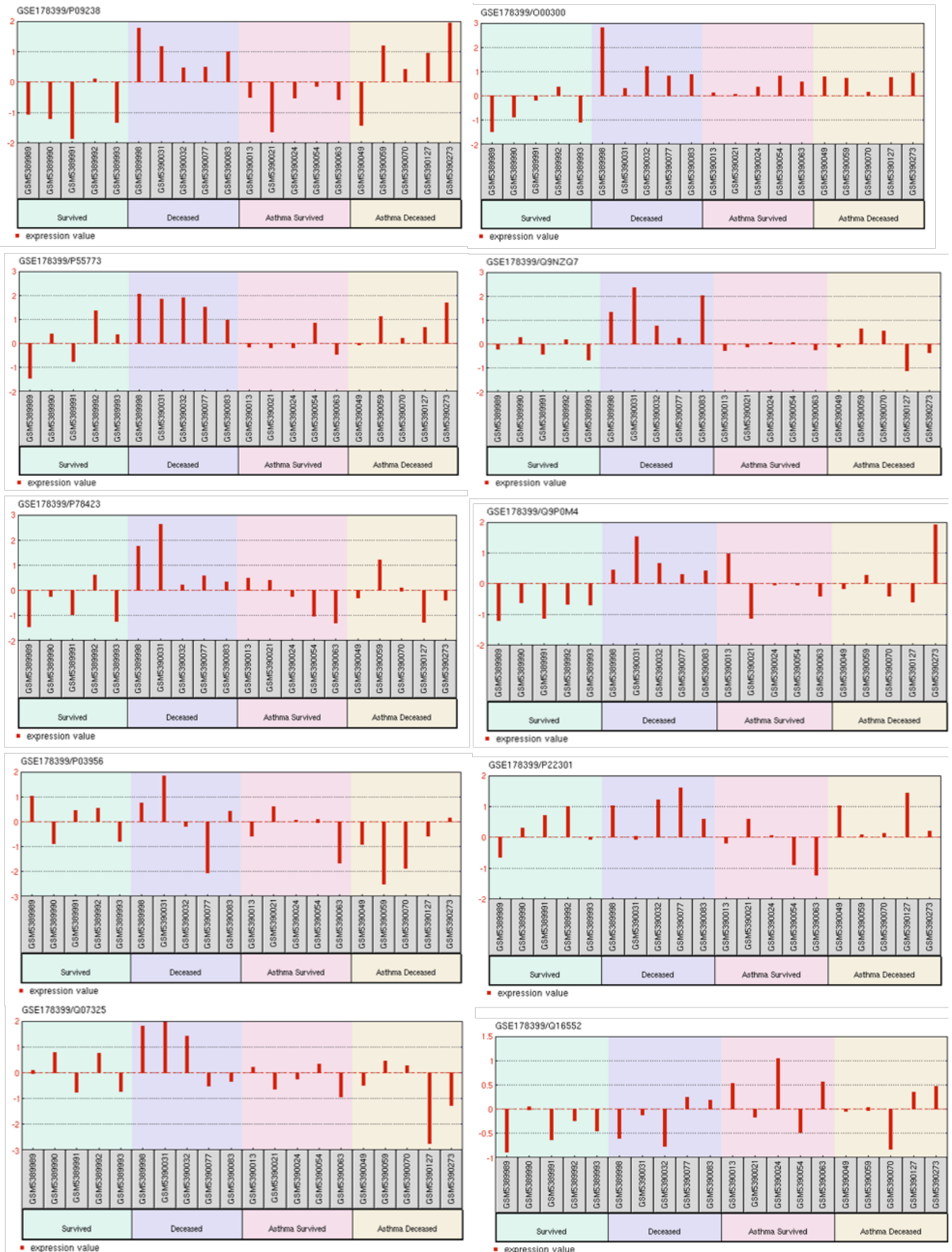


Fig. 4. Expression levels of the ten profile genes studied are varied significantly between the four patient groups.

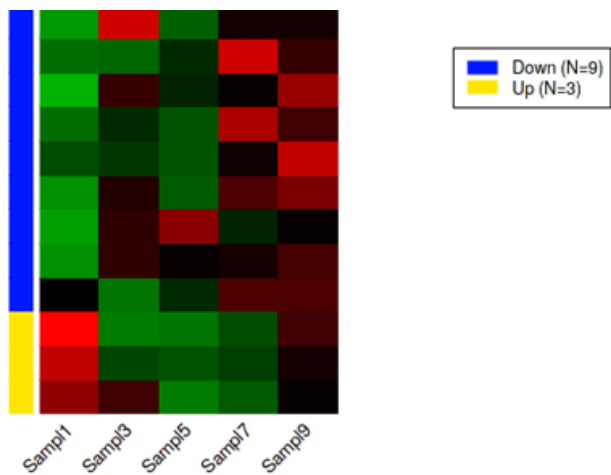


Fig. 5. Heatmap of expression genes shows the correlation of high significant of down regulation.

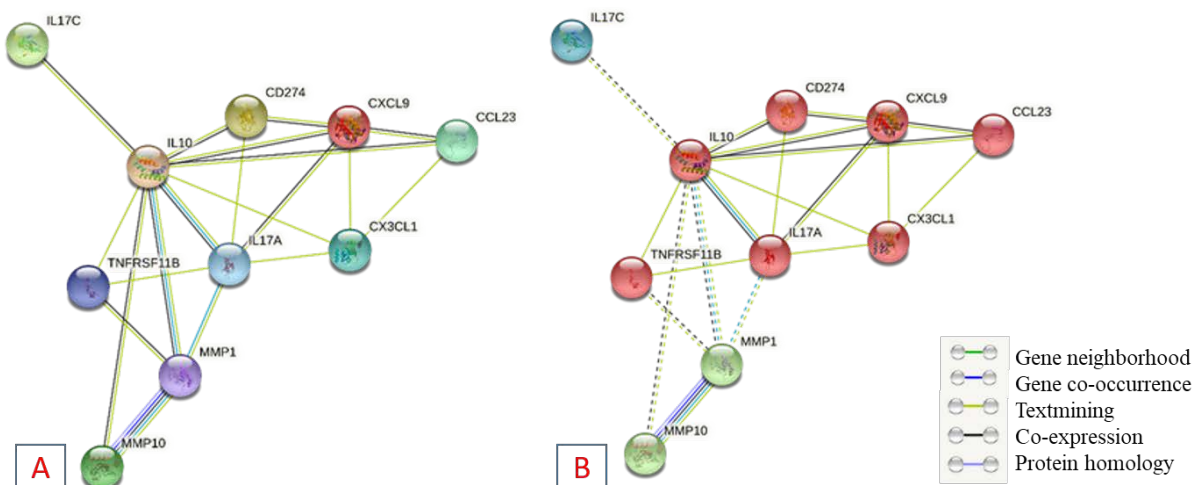


Fig. 6. Multi-interactions views between nodes of immune genes.

a — the pop-ups provide information regarding the nodes and edges between genes; *b* — 7 cluster genes appear in red color with high affinity and cluster with 2 genes in green.

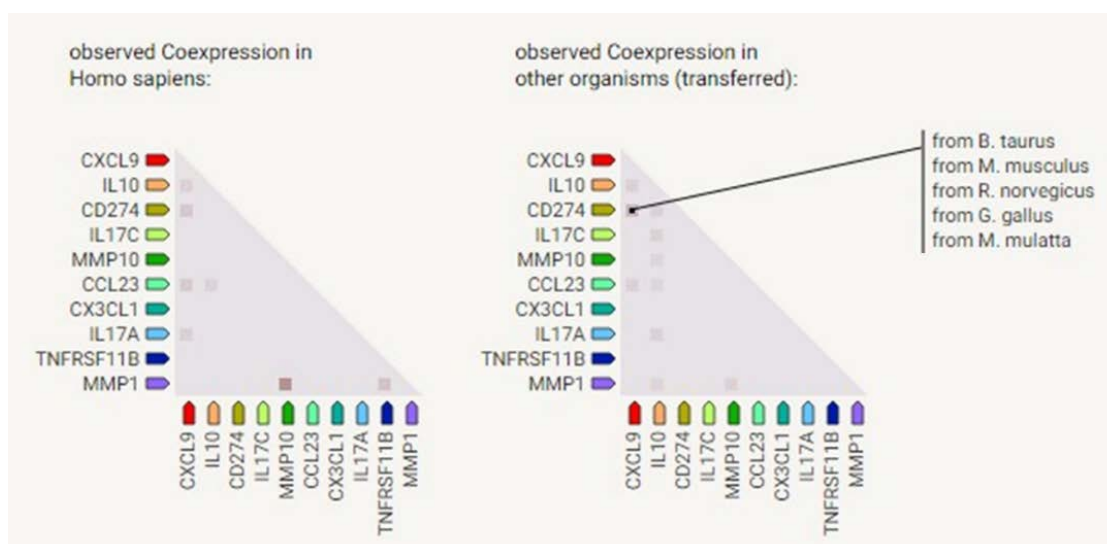


Fig. 7. The correlation between coexpression genes with human pattern and some organisms.

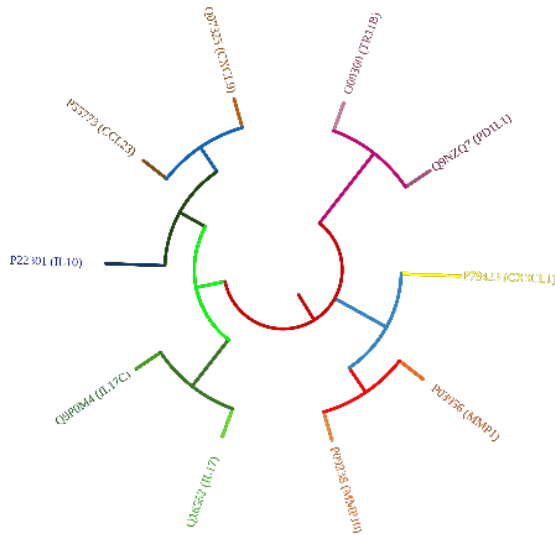


Fig. 8. Phylogenetic tree of 10 genes. Each collection of genes is color-coordinated.

sociated in a way that is distinct from that seen in other organisms. **Figure 8** depicts a phylogenetic tree of the 10 immune-correlated immune genes. Clade Coverage for collapsed groupings of genomes in the phylogenetic tree shows the lowest and highest similarity within that clade as two different hues. Each gene of interest has a color corresponding to the similarity of its best hit inside a specific STRING genome. Interactions can be predicted based on the correlations between these presence/absence profiles. Gene co-occurrence of the correlated gene families with comparable occurrence patterns across genomes is shown in **Fig. 9**.

Discussion

The purpose of this study is to investigate the pathogenetic processes and genetic pathways in COVID-19 patients with and without asthma issues from several biological viewpoints. Transcriptome data have recently been often employed in investigations relating to COVID-19 comorbidity.

Asthma is distinguished by the prolonged inflammation of air passages, leading to chest constriction, wheezing, and coughing. Individuals with persistent asthma have displayed notable decline in lung capacity and resistance to steroid treatments, underscoring the need for novel approaches in developing anti-inflammatory therapies [16].

After choosing 20 patients from this study, splitting them into four groups, and determining the gene expression levels of 92 genes, it was discovered that 6 immune genes out of the 92 had down-regulation of expression (*MMP10*, *TNFRSF11B*, *CCL23*, *CD274*, *CX3CL1*, and *IL17C*). The distribution of gene expression is balanced among the patients who were chosen. In the overall distribution, the number of linked genes was low, but compared to the quantiles, a mathematical increase with a significant theme was detected at $P < 0.05$. Then, a heatmap was used to quantify gene expression, and a stark contrast was seen between unregulated (red) and down-regulated (green).

Because of this discrepancy, 10 genes were selected, knowing that 6 of these genes were the weakest. The degree of the node varied among (1- 9) genes and this is what was observed in Table 2. In terms of both *P* and *adj.P* values, the six genes were the most prevalent.

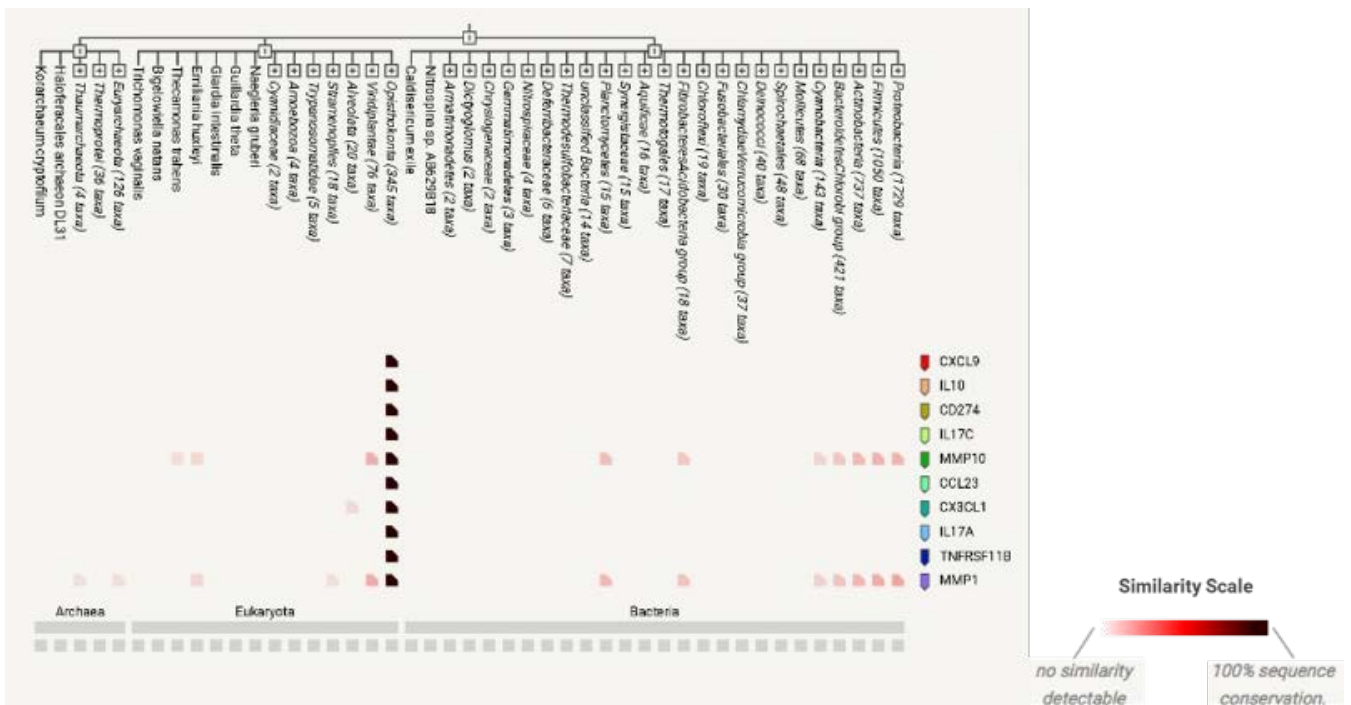


Fig. 9. Gene co-occurrence of gene families whose distribution patterns across genomes are comparable to one another.

Figure 4 depicts the expression of the ten immune proteins in patients, however, in general, the expression of the proteins is nearly the same in the coronavirus group. *MMP10* expression was higher in the second and fourth groups, i.e., in deceased patients, indicating that this gene is not linked to asthma. The identical outcome was conducted for the proteins *CX3CL1*, *IL17C*, *MMP1*, and *IL10*. There is a clear increase in *MMP1* expression in the first and second groups, but a decrease in expression in the third and fourth groups, indicating that this gene is directly associated with asthma disease. Even though the expression of *IL17A* protein was reduced in non-asthmatic patients, an increase in its expression was seen in asthmatic patients, particularly in survivors, indicating that this gene is intimately associated with asthma sensitivity. In contrast to the prior case, it was observed that non-asthmatic patients expressed *CXCL9* at a much higher level than asthmatic patients. This result also suggests that this gene is associated with asthma, but in a reverse way.

The current study's findings demonstrate that the linked genes in COVID-19 individuals with asthma do not change significantly between the survivors and the deceased. In non-asthmatic patients, there is a clear and significant difference in most genes, where the expression was high in the deceased patients, except *IL17A*, where the expression was low in both survivors and dead individuals. The down-regulation of *TP53BP1* (NK) was observed to inhibit the responses of Th17 cells and natural killer cells. Th17 cells primarily function through IL-17 to carry out their activities. Individuals with COVID-19 might exhibit increased levels of IL-17, indicating that focusing on this cytokine could potentially serve as a therapeutic approach to address this disease [17].

Protein-protein interactions (IPP), as illustrated in Figure 6, include gene neighborhood, gene co-occurrence, protein co-expression, text mining, and protein homology, depending on the quality of the binding between proteins. A cluster analysis of the proteomes revealed that two sets of three genes are associated in different ways: the first set of seven genes is shown in red, while the second set of two genes is shown in green according to the linking formula.

Since immune systems are found in so many different types of species, we needed to determine how the prevalence of these proteins in humans compares to that of other types of organisms. According to the degree of similarity scale, there is a clear similarity between the genes of various creatures.

In a cohort of patients admitted with COVID-19, we demonstrate that there is a substantial difference between the cytokine profiles of those who died and those who survived. Our results provide insight into how to best target COVID-19 therapy and prevention efforts for certain subsets of patients [18]. Furthermore, our

findings propose a potential association among certain genes that were initially disregarded across all patients. It was observed that psoriasis patients exhibiting higher-than-average Th17 responses also displayed heightened severity of allergic asthma. Additionally, IL-17 was found to reduce the inhibition of ACE-2 expression, which is a receptor crucially involved in the cellular entry of SARS-CoV-2 [19–21].

A study of 220 asthmatic COVID-19 patients found that asthma was not linked to a higher risk of hospitalization after age, gender, and other diseases were taken into account [22]. The incidence of hospitalizations and fatalities attributable to COVID-19 was surprisingly low, even among patients with the most severe clinical symptoms, which was found in another study of asthmatics treated with biologics.

It is crucial to establish a clear understanding of how SARS-CoV-2 infection progresses in individuals with asthma. This involves examining the impact of asthma itself, any related health conditions linked to asthma, and the treatments used for asthma, all of which may collectively influence the outcomes associated with COVID-19 [23].

While more research is required to determine the exact mechanisms underlying the altered clinical manifestations of COVID-19, our findings indicate a correlation between an imbalance in gene expression and mortality as compared to a surviving group. Clinical trials might present potential defenses against negative viral impacts [24].

Conclusions

Infection with the coronavirus has been linked to a variety of conditions that affect the immune system, including asthma. According to the findings of this study, there are immune genes whose expression can shift in a positive or negative direction depending on the nature of the patient, the type of infection, and whether or not the individual suffers from asthma. There is no correlation between the expression of *MMP10* and asthma, although there is a significant correlation between the expression of *MMP1* and sensitivity. Patients were found to have similar levels of expression for the proteins *CX3CL1*, *IL17C*, *MMP1*, and *IL10*. Patients showed identical expression of the proteins *CX3CL1*, *IL17C*, *MMP1*, and *IL10*. The expression of the *IL17A* protein is reduced in non-asthmatic patients but raised in asthmatic patients, particularly in survivors, which is closely associated with allergic asthma. In contrast, *CXCL9* levels were much greater in non-asthmatic patients. This discovery also suggests that this gene is linked to asthma. The study found that the unbalanced gene expression was associated with mortality relative to the rest of the group. There is no substantial difference in gene expression in asthmatic patients who survive and those who deceased.

ЛИТЕРАТУРА | REFERENCES

- Deng Y., Liu W., Liu K., et al. Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Wuhan, China: a retrospective study. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2020;133(11):1261–7. DOI: <https://doi.org/10.1097/cm9.0000000000000824>
- Давуд А.А., Ясим Б.И., Рияд-аль-Джалили О. Идентификация мутаций поверхностного гликопротеина SARS-CoV-2 в штаммах, изолированных в Ираке. Медицинская иммунология. 2022;24(4):729–40. Dawood A.A., Jasim B., Riyadh Al-Jalily O. Identification of surface glycoprotein mutations of SARS-CoV-2 in isolated strains from Iraq. *Medical Immunology (Russia)*. 2022;24(4):729–40. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IOS-2455> EDN: <https://elibrary.ru/bujrnm>
- Izquierdo J.L., Almonacid C., González Y., et al. The impact of COVID-19 on patients with asthma. *Eur. Respir. J.* 2021;57(3):2003142. DOI: <https://doi.org/10.1183/13993003.03142-2020>
- Ferguson J.E., Patel S.S., Lockey R.F. Acute asthma, prognosis, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017;139(2):438–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.054>
- Nashiry A., Sumi S.S., Islam S., et al. Bioinformatics and system biology approach to identify the influences of COVID-19 on cardiovascular and hypertensive comorbidities. *Brief. Bioinform.* 2021;22(2):1387–401. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa426>
- Herring C., Hernandez Y., Huffnagle B., Toews B. Role and development of TH1/TH2 immune responses in the lungs. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2004;25(1):3–10. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2004-822300>
- Johnston S.L. Asthma and COVID-19: is asthma a risk factor for severe outcomes? *Allergy*. 2020;75(7):1543–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.14348>
- Shen W.X., Luo R.C., Wang J.Q., Chen Z.S. Features of cytokine storm identified by distinguishing clinical manifestations in COVID-19. *Front. Public Health.* 2021;9:671788. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.671788>
- Xia J., Chen S., Li Y., et al. Immune response is key to genetic mechanisms of SARS-CoV-2 infection with psychiatric disorders based on differential gene expression pattern analysis. *Front. Immunol.* 2022;13:798538. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.798538>
- Давуд А.А. Влияние мутационных вариантов спайкового гликопротеина и РНК-зависимой рнк-полимеразы (nsp12) SARS-CoV-2 на участки стыковки с ремдесивиром. Медицинская иммунология. 2022;24(3):617–28. Dawood A.A. Influence of SARS-CoV-2 variants' spike glycoprotein and RNA-dependent RNA polymerase (nsp12) mutations on remdesivir docking residues. *Medical Immunology (Russia)*. 2022;24(3):617–28. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IOS-2486> EDN: <https://elibrary.ru/ygzrvf>
- Schneider D., Hong J.Y., Bowman E.R., et al. Macrophage/epithelial Cell CCL2 contributes to rhinovirus-induced hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of allergic airways disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2013;304(3):L162–9. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00182.2012>
- Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L., et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004;203(2):631–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.1570>
- Dawood A.A., Altobje M., Alrassam Z. Molecular docking of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein with angiotensin-converting enzyme II. *Microbiological Journal.* 2021;83(2):82–92. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.02.08>
- Ge X., Son W., Yao R. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(1):534. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2486-6>
- Pavel A.B., Glickman J.W., Michels J.R., et al. Th2/Th1 cytokine imbalance is associated with higher COVID-19 risk mortality. *Front. Genet.* 2021;12:706902. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.706902>
- Green H., Brightling E., Woltmann G., et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax.* 2002;57(10):875–9. DOI: <https://doi.org/10.1136/thorax.57.10.875>
- Kuo S., Pavlidis S., Loza M., et al. T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED. *Eur. Respir. J.* 2017;49(2):1602135. DOI: <https://doi.org/10.1183/13993003.02135-2016>
- Wu D., Yang O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020;53(3):368–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.005>
- Krueger G., Wharton Jr., Schlitt T., et al. IL-17A inhibition by secukinumab induces early clinical, histopathologic, and molecular resolution of psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019;144(3):750–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.04.029>
- Pavel B., Wu J., Renert-Yuval Y., et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 protein expression in serum is significantly associated with age. *Allergy*. 2021;76(3):875–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/all.14522>
- Zhang H., Penninger M., Li Y., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 2020;46(4):586–90. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
- Gupta A., Bush A., Nagakumar P. Asthma in children during the COVID-19 pandemic: lessons from lockdown and future directions for management. *Lancet Respir. Med.* 2020;8(11):1070–1. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30278-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30278-2)
- Garg S., Kim L., Whitaker M., et al. Hospitalization rates and characteristics of patients hospitalized with laboratory-confirmed coronavirus disease 2019 – COVID-NET, 14 States, March 1–30, 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2020;69(15):458–64. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6915e3>
- Branco A., Sato N., Alberca W. The possible dual role of the ACE2 receptor in asthma and Coronavirus (SARS-CoV2) infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10:550571. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.550571>

Information about the author

Dawood Ali Ade[✉] — Ph.D. Microbiology (Biology science), Dr. (Anatomy department), University of Mosul, Mosul, Iraq, aad@uomosul.edu.iq, <https://orcid.org/0000-0001-8988-5957>

The article was submitted 30.04.2023;
accepted for publication 15.08.2023;
published 28.02.2024

Информация об авторе

Давуд Али А. [✉] — к.б.н., лектор, кафедра анатомии Медицинского колледжа Мосульского университета, Мосул, Ирак, aad@uomosul.edu.iq, <https://orcid.org/0000-0001-8988-5957>

Статья поступила в редакцию 30.04.2023;
принята к публикации 15.08.2023;
опубликована 28.02.2024

ОБЗОРЫ

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-421>



Клеточные культуры в вирусологии: от прошлого к будущему

Кузнецова Т.А.[✉], [Беседнова Н.Н.](#), Алиев М.Р., Щелканов М.Ю.

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

Аннотация

Цель обзора — дать краткую характеристику клеточных культур, полученных из тканей млекопитающих, и рассмотреть текущие возможности и перспективы их использования в вирусологии.

Анализ литературы, представленной в основных базах данных (Web of Science, PubMed, Scopus, Elsevier, Google Scholar и РИНЦ) по состоянию на июль 2023 г., свидетельствует о том, что в вирусологических исследованиях используются различные виды и типы клеточных культур, применение которых имеет ряд преимуществ перед другими методами исследования *in vitro* и *in vivo*. В обзоре приведены многочисленные примеры разработки новых методов получения клеточных культур для культивирования вирусов, в том числе описаны чувствительные и репортёрные клеточные системы, конструирование которых может быть многообещающим инструментом для диагностики существующих и неизвестных вирусных инфекций. Клеточные культуры охарактеризованы как потенциальные модели *in vitro* в вирусологии для разработки диагностических тест-систем и новых лекарственных противовирусных препаратов, как субстрат для производства культуральных вакцин. Описано применение культур клеток для исследования влияния вирусов на иммунную систему макроорганизма или механизмов иммунопатогенеза вирусных инфекций. Сделан вывод о том, что использование клеточных культур остаётся одним из важнейших методов в практической вирусологии и в научных исследованиях.

Ключевые слова: обзор, клеточные культуры, вирусологические исследования, репортёрные клеточные линии, вакцины, цитокины, иммунопатогенез

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: Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Алиев М.Р., Щелканов М.Ю. Клеточные культуры в вирусологии: от прошлого к будущему. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1): 143–153.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-421>

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

Review
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-421>

The cell cultures in virology: from the past to the future

Tatyana A. Kuznetsova[✉], [Natalia N. Besednova](#), Maxim R. Aliev, Michail Yu. Shchelkanov

G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia

Abstract

The aim of the review is to give a brief characteristic of cell cultures obtained from mammalian tissues and to consider the current possibilities and prospects for their use in virology.

The analysis of the literature data presented in the main databases, such as Web of Science, PubMed, Scopus, Elsevier, Google Scholar and RSCI (as of July 2023), indicates that various types of cell cultures are currently used in virological studies. The use of cell culture has a number of advantages over other *in vitro* and *in vivo* methods of virological research. The review provides numerous examples on the development of new methods

of obtaining cell cultures for the cultivation of viruses. Among them are sensitive and reporter cell systems, the design of which can be a promising tool for diagnostics of existing and new unknown viral infections. Cell cultures are characterized as potential *in vitro* models in virology for developing new diagnostic test-systems and antiviral drugs. An important area of cell cultures application is their use as a substrate for the production of culture-derived vaccines. Another aspect of the cell cultures application is also highlighted, such as the study of the effect of the viruses on the host immune system or the mechanisms of immunopathogenesis of viral infections. It is concluded that the use of cell cultures remains currently and in the near future one of the most important methods in practical virology and in scientific research.

Keywords: review, cell cultures, virological research, reporter cell lines, vaccines, cytokines, immunopathogenesis

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: Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Aliev M.R., Shchelkanov M.Yu. The cell cultures in virology: from the past to the future. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):143–153.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-421>

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

Введение

Основные принципы культивирования тканей были впервые представлены В. Ру в 1885 г. и базировались на разработке С. Рингером солевых (физиологических) растворов, предназначенных для поддержания работы изолированного сердца животного. В дальнейшем Г. Хаберландт показал возможность культивирования изолированных культур растительных тканей, представив в 1902 г. идею о том, что растительные клетки способны дать начало полноценному растению. В 1940–1950-х гг., с эры антибиотиков и разработки питательных сред, методы культивирования клеток получили значительное усовершенствование и стали широко применяться в вирусологии. К 1954 г. относится создание Д. Солком вакцины против полиомиелита, что стало возможным благодаря открытию способности вируса полиомиелита расти в культурах различных тканей, сделанному Д.Ф. Эндерсом, Т.Х. Уэллером и Ф.Х. Роббинсом, и было ознаменовано получением последними Нобелевской премии.

В настоящее время клеточные культуры (КК) используются в различных областях научных исследований — от клеточной и молекулярной биологии до прикладной биотехнологии, а также находят широкое применение в медицинской практике. Прежде всего, КК являются инструментом для исследований в области вирусологии, а также для разработки новых терапевтических подходов и лекарственных противовирусных препаратов, вакцин, диагностических тест-систем. КК могут быть использованы как модель *in vitro* для изучения влияния различных факторов (рН, температуры, аминокислот, витаминов, гормонов, лекарственных препаратов и т.д.) на рост и развитие клеток *in vivo* [1]. КК применяются и для изучения иммунопатогенеза вирусных инфекций.

С понятием КК тесно связан термин «клеточная линия» (КЛ) — это совокупность клеток, по-

лученная из первичной КК путём увеличения их количества в результате ряда генераций с преобладанием клеток или линий дифференцировки с высокими темпом роста и однородностью клеточной популяции.

Выращивание вирусов в КК в значительной степени обеспечило прогресс вирусологии. Современные методы молекулярной биологии позволили развивать генетически модифицированные КК для выявления вирусов, более чувствительные и информативные, чем ранее применяемые. Разрабатываются новые модели для исследований *in vitro*, а также новые методы получения КК для культивирования вирусов, в числе которых чувствительные и репортёрные клеточные системы. Однако ни одна из используемых репортёрных систем не является универсальной — все они наряду с преимуществами имеют недостатки, что ограничивает их применение для некоторых исследований. Высокоактуальными остаются работы по модификации широко используемых репортёрных систем, усовершенствованию методов определения активности репортёрных генов, поиску новых репортёров и по исследованию других био- и нанотехнологических аспектов с применением КК.

Цель обзора — дать краткую характеристику КК, полученных из тканей млекопитающих, и рассмотреть текущие возможности и перспективы их использования в вирусологии.

Виды и типы клеточных культур

КК — это гомогенная популяция генетически однородных клеток, полученных из тканей человека или животных, растущих в постоянных условиях, в специальной питательной среде при контролируемой температуре, влажности и уровне углекислого газа [1]. Наиболее распространёнными культурами дифференцированных клеток являются первичные или первично-трипсинизированные КК. Это КК,

получаемые преимущественно из эмбриональной ткани человека (при прерывании беременности) или из смеси нескольких тканей эмбриональных органов животных и человека (почек, лёгких, кожи, тимуса, тестикул эмбрионов или молодых животных), клетки которых обладают более высоким потенциалом роста. Первичные КК получают также из фибробластов, кератиноцитов, меланоцитов, эндотелиальных и мышечных клеток, гематопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток [2, 3]. Такие КК обладают рядом преимуществ по сравнению с опухолевыми и иммортализованными клетками, поскольку в большей мере соответствуют клеткам *in vivo*. Культуры из тканей животных легкодоступны. Доступность культур из клеток человека определяется типом ткани, из которой они получены. Кроме того, такие КК несут генотип донора, что важно для изучения причин патологии конкретного пациента на молекулярном уровне.

КК классифицируются в два типа в зависимости от используемой системы лабораторного культивирования: адгезивные и суспензионные [2]. Адгезивным КК для роста необходимо прикрепиться к поверхности лабораторного пластика или друг к другу. Примерами адгезивных клеточных линий (КЛ), используемых в вирусологии, являются A549 (эпителий лёгких человека), Vero (эпителий почек африканской зелёной марышки), MRC-5 (фибробласты лёгких человека) и др. [2].

Суспензионные КК — это перевиваемые клетки, способные к размножению в свободно суспендированном состоянии. Ряд линий перевиваемых клеток — ВНК-21 (перевиваемая монослойно-суспензионная сублиния клеток почки новорождённого сирийского хомячка), HepG2 (КЛ гепатоцеллюлярной карциномы человека), МДБК (КК почки телёнка) и др. — были адаптированы к размножению в этих условиях [2]. Использование суспензионных КК открывает возможности для промышленного производства противовирусных вакцин и диастикомов. Разработан подход к культивированию суспензионных культур с применением различных микроносителей (сефадекс, силикагель, цитолар и др.), где культивируемые клетки формируют монослой.

Для увеличения накопления вирусов используются смешанные КК. В этом случае разные типы клеток выращиваются в виде монослоя в одном флаконе, что выгодно для изоляции вирусов из клинических образцов, содержащих более одного вируса. Это способствует уменьшению количества КК, которые будут подвергаться инфицированию с последующей идентификацией типа вируса при помощи иммуофлюоресцентного или молекулярного анализа. Например, КЛ MRC-5 и A549 можно использовать в качестве смешанного монослоя для диагностики цитомегаловируса человека, вируса простого герпеса, аденовирусов [4].

В вирусологических исследованиях в последнее время нашли применение КК рыб. Это объясняется их универсальностью, экономической эффективностью, удобством в обработке и лёгкостью генетических манипуляций над ними. Кроме того, такие КК можно поддерживать в течение более длительного времени из-за более низких показателей метаболизма рыб. Список доступных линий к КК, включая виды рыбы и ткани, представлен в Американской коллекции культур¹ и Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур² [5].

Перевиваемые КК — это клетки, способные к размножению вне организма неопределённо длительное время, стабильны при культивировании *in vitro*. В лабораторных условиях такие КЛ поддерживают путём длительных пересевов в определённом режиме культивирования. Клетки таких КК имеют гетероплоидный набор хромосом, число которых может значительно колебаться, достигая 120 (например, в клетках сирийского хомячка).

Диплоидные КК — это морфологически однородные клеточные популяции, содержащие полный набор хромосом (генетического материала), получаемые из первичных КК. Их источником являются различные ткани или органы человека или животного, не имеющих онкологических и других врождённых аномалий. Диплоидная КК имеет ограниченный срок жизни, стабилизируется в процессе культивирования *in vitro*, характеризуется тремя фазами роста и сохраняет в процессе пассирования стабильный кариотип, свойственный исходной ткани, а также не обладает опухолевой активностью. Примерами диплоидных КК являются М-22 (диплоидный клеточный штамм фибробластов кожи и мышцы эмбриона человека), Wi-38 (диплоидная КК лёгочной ткани abortированного плода), MRC-5 (диплоидные клетки лёгочной ткани 14-недельных человеческих эмбрионов мужского пола), DBS-FR_h-2 (диплоидная КЛ эмбриональной ткани макак резус) и др. [6, 7]. С использованием КЛ диплоидных клеток человека готовят вакцины против полиомиелита, краснухи, бешенства, аденовирусов, вируса герпеса, цитомегаловируса человека, риновируса и др. [6–9]. В рамках новых медицинских технологий диплоидные КЛ (в частности, линия аллогенных фибробластов) широко применяются в заместительной терапии [10].

Для получения КК, изучения их морфофункциональных свойств, накопления биомассы и хранения, а также для обеспечения клеточным материалом учреждений здравоохранения, научных и производственных лабораторий в России и за рубежом существуют национальные коллекции КК.

¹ American Type Culture Collection. URL: <http://www.atcc.org>

² European Collection of Authenticated Cell Cultures. URL: <http://www.ecacc.org.uk>

В России самая большая коллекция перевиваемых КЛ позвоночных находится в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского. Эта коллекция представлена в «Каталоге Всесоюзной коллекции клеточных культур» [11], «Каталоге Российской коллекции клеточных культур» [12], «Human and animal cell lines catalogue» [13]. На каждую из представленных в каталогах культур имеется паспорт, включающий историю получения, условия культивирования, данные по морфологии и кариологии, чувствительности к вирусам, туморогенности и контаминации.

Любая КЛ, используемая для культивирования вирусов, характеризуется чувствительностью, к которой относятся восприимчивость и перmissивность. Чувствительность — это способность клетки к заражению небольшим количеством вируса независимо от его вида. Чувствительность к специфическим вирусам зависит как от вируса, прикрепленного к рецепторам клеточной мембраны, так и от генов-хозяев, связанных с клеточным противовирусным ответом или с присутствием соответствующих рецепторов на поверхности клеток. Восприимчивость — это свойство КЛ инфицироваться определенными видами вирусов. Восприимчивость может быть повышена за счёт усиления экспрессии вирус-связывающих клеточных рецепторов. Перmissивность — способность клеток поддерживать размножение вируса, т.е. обеспечивать транскрипцию и репликацию генетического материала, полноценную сборку вирионов. В лабораторных условиях перmissивность может быть достигнута путём нокаута одного из генов противовирусного ответа или простого выбора из лабораторной коллекции чувствительных КЛ. Улучшение этих двух свойств делает КЛ удобным инструментом для выделения и исследования вирусов. Чувствительность не всегда коррелирует с перmissивностью [14–16].

Разработан ряд технологий повышения чувствительности КК для улучшения подходов к изучению жизнеспособных вирусов. Прежде всего, это разработка чувствительных КЛ. Одна из первых чувствительных КЛ была получена для Human alphaherpesvirus-1 (НАНВ-1) и содержит вирусный белок VP16 (известный как α -TIF). Наличие VP16 делает клетки более чувствительными к НАНВ и в 200 раз увеличивает накопление вируса [17]. С 1990 г. началось исследование чувствительности КК к разным штаммам вируса гриппа А (H1N1, H2N2, H3N2), В, С, выделенным во время эпидемий [18].

Проблемам поиска КЛ, чувствительных к различным ДНК- и РНК-содержащим вирусам, посвящены многие работы [16, 18–20]. При изучении чувствительности КЛ в отношении ротавируса, благодаря нокауту одного гена в клетках Vero, достигнуто 18-кратное увеличение роста ротавируса [16]. В результате исследования чувствительности

вируса Зика выявлены 7 КЛ из разных тканей, к которым этот вирус демонстрирует тропизм [21, 22]. Тем не менее методы получения чувствительных КЛ часто требуют много времени и не всегда легко выбрать КЛ, которая будет чувствительной и селективной для определённого типа вируса.

А.А. Dolskiy и соавт. подразделяют подходы для идентификации и изучения вирусов с использованием КК [14]. К первому подходу авторы относят метод бляшкообразования, связанный с цитопатическим эффектом вируса (cytopathogenic effect, CPE) и основанный на способности вируса размножаться, проникая в клетку. Как известно, вирусная репликация сопровождается морфологическими и биохимическими изменениями клеток хозяина, в конечном итоге приводящими к разрушению или лизису клеток. Такие видимые клеточные изменения выявляются микроскопически и отражают количество погибших клеток [14, 23]. В большинстве случаев CPE можно выявить через 5–10 дней инкубации. Для некоторых вирусов, включая цитомегаловирус, требуется 10–30 дней, а, например, для вируса НАНВ-2 CPE наблюдается уже через 24 ч. Однако методы CPE являются трудоёмкими, демонстрируют низкую чувствительность и не подходят для ряда вирусов, не оказывающих цитопатического эффекта, и в таких случаях необходимы дополнительные исследования [14].

Второй подход авторы связывают с генерацией репортёрных КЛ, в которых специфические клетки в ответ на инфицирование вирусом модифицируются и продуцируют репортёрный белок. Репортёр должен быть высокоспецифичным для определённого вируса. После инфицирования вирусный белок распознаёт репортёрную конструкцию в виде вирусного генома или химерного белка. Ключевой особенностью репортёрной клеточной конструкции является репортёрный ген. Это ген, встраиваемый в геном-инженерную конструкцию, кодирующий нейтральные для клетки белки, т.е. не оказывающий влияния на физиологию клетки, экспрессию которого в КК можно наблюдать путём анализа или количественного измерения его продукта, обычно фермента. Репортёрными генами могут служить гены, кодирующие флуоресцентные и люминесцентные белки и ферменты. В их числе гены, кодирующие бактериальные ферменты β -галактозидазу, β -глюкуронидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, гены фермента люциферазы светлячка, а также используемый в качестве белка-репортёра зелёный флуоресцентный белок и др. [14]. Этот подход имеет целью адаптировать методы с использованием КК, сделать их более простыми, удобными и информативными. Применение репортёрных КЛ позволяет дифференцировать конкретные виды вирусов или семейства вирусов и может быть использовано для количественных

исследований в качестве более быстрого аналога метода СРЕ [14].

Репортёрные системы применяются в основном для получения КК человека и млекопитающих с высоким и стабильным уровнем наработки целевого белка для получения рекомбинантных белков в больших количествах для медицинских и исследовательских целей, например, для производства в биореакторах вакцинных и лекарственных препаратов. Для обнаружения репортёрной активности при исследовании различных семейств вирусов в зависимости от структуры генома и жизненного цикла существуют различные системы. Так, РНК-вирусы с отрицательной полярностью (*Orthomyxoviridae* и *Filoviridae*), реплицирующиеся в ядре хозяина, обнаруживают с использованием минигенома — сокращённой версии вирусного генома, содержащей 3'- и 5'-концевые остатки генома, необходимые для репликации и транскрипции. В минигеноме все вирусные гены удаляют и заменяют одним (невирусным) репортёрным геном, например, кодирующим флуоресцентные или люминесцентные белки (зелёный флуоресцентный белок, β-галактозидазу и др). Репортёрная система для РНК-вирусов с положительной полярностью, например *Alphavirus* семейства *Togaviridae* и *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*, также включает в себя минигеномную конструкцию, распознаваемую вирусными белками [24]. В качестве примера на рисунке схематически представлена молекулярная репортёрная система для обнаружения РНК-содержащих ретровирусов (например, HIV семейства *Retroviridae*) и вирусов с геномом двухцепочечной ДНК (например, HANV-1, 2, 3 и цитомегаловирус семейства *Herpesviridae*) или частично двухцепочечного вируса гепатита В (семейства *Hepadnaviridae*). РНК-содержащие ретровирусы имеют уникальный путь репродукции. После проникновения в клетку генетическая информация с РНК этих вирусов переписывается на ДНК путём обратной транскрипции. Этот путь осуществляется с участием фермента обратной транскриптазы или ревертазы, который вносится в клетку в составе ретровирусов. Вновь образованная ДНК интегрирует с клеточным геномом и в его составе участвует в образовании информационной РНК (иРНК), необходимой для синтеза вирусных белков. Транскрипцию интегрированной ДНК в составе клеточных геномов (переписывание информации с ДНК на иРНК) осуществляет ДНК-зависимая РНК-полимераза. Таким образом, у ретровирусов отмечается уникальный путь передачи генетической информации: РНК → обратная транскрипция → ДНК → транскрипция → иРНК → трансляция → белок [14].

Разработка репортёрных КЛ внесла огромный вклад не только в вирусологические исследования, но и в производство вакцин. Несмотря на то что

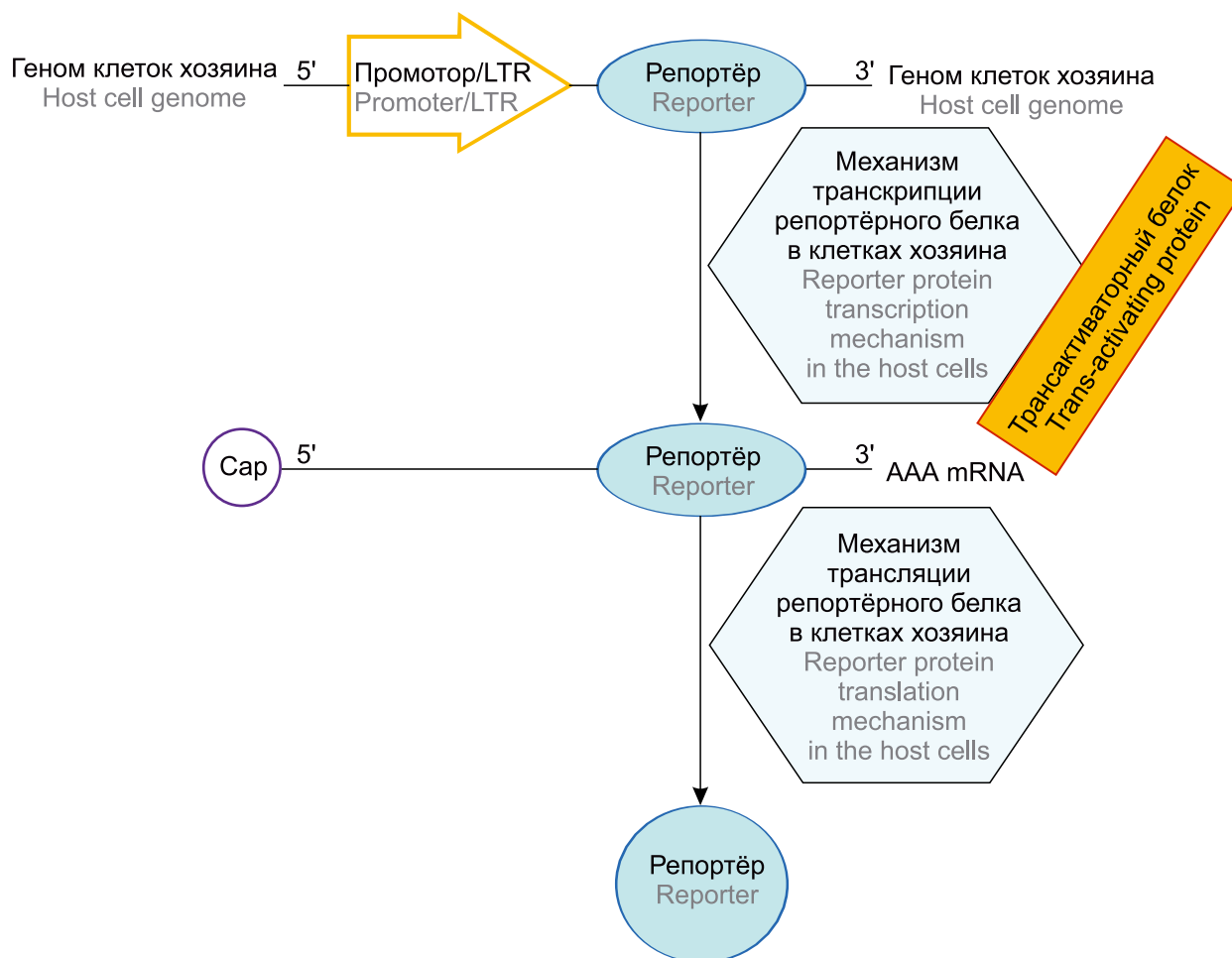
репортёрные КЛ требуют наличия лабораторий с определённым уровнем биобезопасности, как впрочем и все работы с КК, по мнению ряда авторов, они менее трудоёмки, чем метод бляшкообразования [24, 25]. Другим преимуществом таких КЛ является более быстрое исследование вирусов, включая оценку титров вируснейтрализующих антител и антивирусной активности, т.е. этот метод требует меньшего времени для осуществления, а результаты могут быть получены в течение 12–48 ч [26]. Преимуществом также является тот факт, что репортёрные КЛ могут обнаружить небольшое количество инфицированных клеток. Например, репортёрные КЛ для вируса ветряной оспы, основанные на активности люциферазы, могут использоваться для выявления менее 10 инфицированных клеток на образец [27].

В настоящее время разработаны многочисленные репортёрные КЛ для культивирования различных вирусов, в том числе гриппа А [24], гепатита С [28], иммунодефицита человека [29, 30]. Недавно сконструированы новые репортёрные КЛ для коронавируса SARS-CoV-2, основанные на активности репортёрных генов, кодирующих флуоресцентные или люминесцентные белки. Эти КЛ рекомендованы для поиска эффективных противовирусных препаратов, в частности ингибиторов вируса SARS-CoV-2 [15, 31, 32].

Таким образом, репортёрные клеточные системы подходят как для базовых вирусологических исследований, так и для поиска противовирусных препаратов. Кроме того, такие системы перспективны в плане разработки новых КЛ для культивирования вирусов и служат источником выделения вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека.

Клеточные культуры в диагностике вирусных инфекций

Несмотря на то что в последние годы технологические достижения, включая гибридные технологии и разработку моноклональных антител, а также методов молекулярной диагностики, предложили надёжные инструменты для обнаружения вирусных инфекций, их диагностика традиционно опирается на использование КК. Что касается применения ПЦР-метода как одного из самых точных и чувствительных в диагностике вирусных заболеваний, некоторые авторы отмечают, что чувствительность метода ниже таковой при применении КК для культивирования определённых вирусов, например вирусов кишечных инфекций человека [33, 34]. Кроме того, методы на основе ПЦР позволяют обнаружить только вирусный геном, а не живой вирус, эти методы дороги и требуют значительного опыта, а их использование может быть связано с ложноположительными результатами [33].



Молекулярная репортёрная система для обнаружения РНК-содержащих ретровирусов и вирусов с геномом двухцепочечной ДНК. В неинфицированных клетках нет синтеза мРНК с вирусного промотора. После инфицирования клеток начинаются транскрипция и трансляция репортёрного белка в присутствии вирусного белка.

Геном или минигеном клеток хозяина — сокращенная версия вирусного генома, содержащая 3'- и 5'-концевые остатки генома, необходимые для репликации и транскрипции; промотор — участок ДНК, ответственный за связывание с РНК-полимеразой; LTR (long terminal repeat, длинный терминальный повтор) — участок генома, центр контроля экспрессии генов; репортёр — ген, встраиваемый в генно-инженерную конструкцию и кодирующий нейтральные для клетки белки; трансактиваторный белок — регуляторный белок, участвующий в транскрипции вирусного генома; механизм транскрипции репортёрного белка, осуществляемый в присутствии вирусного белка в клетках хозяина; механизм трансляции репортёрного белка, осуществляемый в присутствии вирусного белка в клетках хозяина; Cap 5' — 5'-концевой остаток или участок генома; 3' AAA mRNA — 3'-концевой остаток поли-А-области матричной РНК.

Molecular reporter system for detecting RNA-containing retroviruses and viruses with a double-stranded DNA genome. In uninfected cells, there is no mRNA synthesis from the viral promoter. After the infection of the cells, the transcription and translation of the reporter protein begin in the presence of a viral protein.

Host cell genome or minigen(ome) — a minimal gene fragment containing 3'- and 5'-terminal genome residues necessary for replication and transcription; Promoter/LTR — DNA site responsible for binding to RNA polymerase; LTR — long terminal repeat, genome site, gene expression control center; Reporter — a gene embedded in a genetically engineered structure and encoding cell-neutral proteins; Host cell transcription machinery — reporter protein transcription mechanism carried out in the presence of a viral protein in the host cells; Trans-activating protein — regulatory protein involved in viral genome transcription; Host cell translation machinery reporter protein translation mechanism carried out in the presence of a viral protein in the host cells; Cap 5' — 5'-terminal residue of genome; 3' AAA mRNA — 3'-terminal residue of poly-A region of matrix RNA.

Простое обнаружение вируса с использованием молекулярных методов — это только первый шаг; необходимо определить, связан ли идентифицированный возбудитель с заболеванием, что можно выявить только с помощью КК, называемой авторами «золотым стандартом» в выявлении вирусов

и обнаружении причинно-следственной связи с заболеванием [34].

КК широко применяют для получения моноклональных антител, используемых при разработке диагностических тест-систем и представляющих перспективу для терапии инфекций. Так, разрабо-

таны тест-системы для диагностики вируса гриппа А и В, вируса иммунодефицита человека, вируса простого герпеса, вирусов гепатита А, В и С, SARS-CoV-2, вируса клещевого энцефалита, цитомегаловируса, вируса краснухи, респираторно-синцитиального вируса и др. [34–37].

Таким образом, отвечая на вопросы, поставленные D.S. Leland и соавт.: «является ли выделение вирусов на КК все ещё полезным подходом в диагностике вирусных инфекций?» и «будут ли КК в будущем применяться в лабораторной диагностической вирусологии?» [38], можно смело дать утвердительный ответ.

Клеточные культуры в разработке вакцин и лекарственных препаратов

Важным аспектом применения КК является вакцинология. КК используются в качестве субстрата для производства культуральных вакцин. Разрабатываются дизайнерские линии для производства противовирусных вакцин [39]. С использованием КК получены различные вакцины, в том числе против вирусов простого герпеса-1, 2 и 3, гепатита В, краснухи, гриппа А и В, клещевого энцефалита, полиомиелита, кори, паротита и др. [14, 39–41].

В Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова разработана живая полиовакцина трех типов на первичных КК почек обезьян. Исследована репродукция вакцинных штаммов Л-16 вируса кори и Л-3 вируса паротита на клетках линии М-22, что открыло перспективы для создания отечественной тривакцины. С использованием линии М-22 и ленинградского вакцинного штамма «Орлов-Д» разработана первая отечественная вакцина против краснухи. Сотрудниками этого НИИ разработана новая линия 4647 на основе почек зелёных мартышек, идентичная зарубежной линии Vero (эпителий почки африканской зелёной мартышки), пригодная для выпуска различных вакцин, производимых в настоящее время в России. Важным положительным качеством линии 4647 является широкий спектр чувствительности к вирусам практически всех таксономических групп. С использованием этой линии приготовлены экспериментальные серии вакцины против вируса бешенства, а также первая в отечественной практике вакцина против вируса гепатита А, экспериментальные серии вакцин против вирусов клещевого энцефалита, натуральной оспы и др. [42]. Для получения первой отечественной противогерпетической вакцины «Витагерпавак» разработана и охарактеризована по требованиям ВОЗ вакцинная линия клеток Vero (B) [43].

КК млекопитающих также применяют для выделения вирусных антигенов с целью получения ДНК-вакцин. В этом случае вакцинные КК получают при использовании техники рекомбинантных ДНК и векторов экспрессии для КК. Выпуск куль-

туральных и генно-инженерных вакцин связан с получением больших объёмов вируса, в связи с чем в настоящее время для их производства применяются биореакторы. В работе Z. Fang и соавт. представлены широкие возможности использования биореакторов для получения вакцин и сделано заключение о том, что биореакторы способны обеспечить более масштабное и экономически эффективное производство вакцин для удовлетворения глобального спроса здравоохранения [44].

Системы экспериментальных моделей на КК применяются также на этапах доклинических испытаний для подтверждения безопасности, эффективности, стандартизации и валидации новых лекарственных средств, в частности противовирусных препаратов, а также биологически активных веществ, косметических средств и пищевых добавок [45–49]. Отмечается, что использование различных КК в качестве тест-объектов способствует выбору наилучшей системы для оптимальной оценки новых фармакологических, лечебных и косметических средств [50, 51].

Клеточные культуры для изучения иммунопатогенеза вирусных инфекций

КК также служат для решения не менее важной задачи — исследования влияния вирусов на иммунную систему макроорганизма или механизмов иммунопатогенеза вирусных инфекций, а также механизмов синтеза цитокинов. В качестве примера можно привести исследование механизмов иммунопатогенеза новой коронавирусной инфекции. Поскольку клетки Vero, которые являются стандартной культурой для выращивания SARS-CoV-2, не имеют генов IFN типа I и не могут использоваться для анализа продукции цитокинов [52], в поисках подходящей системы *in vitro* протестировано несколько IFN-компетентных КЛ человека в отношении этого вируса. В результате ряда исследований отобраны клетки линии Caco-2 (эпителиоподобная линия клеток аденокарциномы ободочной кишки человека) и HEK 293 (КЛ почек эмбриона человека) как полезные системы для изучения влияния SARS-CoV-2 на независимую от иммунной системы индукцию цитокинов [47, 48, 53]. M. Spiegel и соавт. установили, что вирус SARS-CoV-2 способен значительно подавлять противовирусный цитокиновый ответ инфицированных клеток [54]. Однако индукция хемокинов IP-10 и IL-8 избегает подавления SARS-CoV-2 в клетках Caco-2, но не в HEK 293. На основании этих исследований авторами сделано заключение о том, что SARS-CoV-2 эффективно блокирует механизмы врождённого иммунитета клеток-хозяев на очень ранней стадии заражения, выигрывая время для колонизации хозяина. Эти данные объясняют, как быстрый рост титров вируса на начальной стадии заболевания, вызванный подавлением продукции

противовирусных цитокинов и прогрессирующей инфильтрацией иммунных клеток в инфицированные лёгкие, связан с выработкой хемокинов инфицированными тканевыми клетками [54]. Учитывая, что в патогенезе новой коронавирусной инфекции имеет место активация цитокинов, приводящая к эндотелиальной дисфункции, способствующей прокоагулянтному состоянию и тромбообразованию, исследовано влияние SARS-CoV-2 на уровень провоспалительных цитокинов, хемокинов и тканевого фактора у человека с использованием культуры микрососудистых эндотелиальных клеток человека (HMEC-1). M. Dolci и соавт. показали, что HMEC-1 *in vitro* подвержены инфицированию SARS-CoV-2 и способствуют амплификации вируса, который в свою очередь может вызвать увеличение продуцируемых медиаторов [55].

Клеточные культуры в биотехнологических разработках

В нашем обзоре рассматриваются традиционные монослойные (2D) КК. Однако в 2D-КК невозможно воспроизвести клеточное микроокружение, которое существует *in vivo*. Культивирование клеток в трёхмерном пространстве (3D) способно устранить эти ограничения. 3D-КК обычно выращиваются в биореакторах, в которых клетки могут превращаться в 3D-клеточные колонии. 3D-культивирование включает многочисленные типы клеток и тканей, компоненты среды и биохимическое микроокружение в их взаимодействии. Существует множество платформ, используемых для выращивания 3D-клеточных структур, включая различные системы каркасов, таких как твёрдые или гидрогелевые матрицы [56]. В качестве примера можно привести углеродные нанотрубки, используемые в тканевой инженерии в роли каркасного материала для 3D-культивирования клеток, поскольку они имеют геометрически близкую структуру с коллагеном — белком соединительной ткани животных. Этот материал способен создать соответствующее микроокружение клеток, обеспечивая их пролиферацию и дифференцировку [57]. Широкое применение в создании биоинженерных гидрогелевых каркасов получили природные биополимеры из морских гидробионтов, позволяющие максимально имитировать структуру и свойства тканей и органов и создавать близкое к натуральному клеточное микроокружение [58]. Такие каркасы способствуют эффективному заселению стволовыми клетками и их дифференцировке в нужные типы клеток с целью последующего использования в заместительной и клеточной терапии, реконструкции различных тканей и органов, что является одним из перспективных направлений в биотехнологии с использованием КК [10, 59–61]. G. Varan и соавт. подчёркивают важность использования 3D-методов

культивирования клеток для изучения патогенеза инфекционных заболеваний и для характеристики новых вакцинных препаратов [41].

Заключение

Таким образом, возможности применения КК в вирусологии весьма разнообразны. Использование КК в настоящее время и в ближайшей перспективе остаётся одним из важнейших методов в вирусологии и на протяжении десятилетий рассматривается как «золотой стандарт» для лабораторной диагностики вирусных заболеваний.

Очевидны преимущества КК как экспериментальных систем *in vitro* по сравнению с исследованиями на животных *in vivo*: результаты экспериментов, требующих использования большого числа лабораторных животных или куриных эмбрионов и соблюдения определённых этических норм, могут быть с аналогичной статистической достоверностью получены на КК. Кроме того, клетки в КК могут быть подвержены воздействию токсинов, гормонов, радиоактивных веществ в любых количествах и на любой период времени.

С применением методов молекулярной биологии повышены чувствительность и специфичность КК для определённых вирусов путём генерации репортёрных КЛ. Разработка новых репортёрных КЛ в сочетании с молекулярными методами диагностики является многообещающим инструментом для выявления существующих, а также новых неизвестных вирусных инфекций.

Применение чувствительных КК представляет чрезвычайную важность для изучения иммунопатогенеза вирусных инфекций и при разработке подходов для лечения вирусных заболеваний, а также для разработки новых лекарственных противовирусных препаратов и диагностических тест-систем. Особое внимание следует при этом уделять изучению вирусов с высокой степенью изменчивости генома, таких как коронавирусы, вирусы гриппа, ВИЧ и др., способных приводить к эпидемиям. Это касается не только вирусов, инфицирующих человека, но и вирусов, патогенных для животных и сельскохозяйственных растений.

Кроме того, возможность накопления вируса в виде культуральной жидкости при соблюдении полной её стерильности в отношении посторонней флоры представляет особую важность для разработки вакцин. В результате получены многочисленные высокоэффективные вакцинные препараты для профилактики вирусных инфекций.

Используя КК, можно охарактеризовать свойства вирусов, обеспечить непрерывность контроля за развитием инфекционного процесса, что чрезвычайно важно при разработке подходов к лечению новых вирусных заболеваний. Кроме того, морфология вирусов, выращенных на КК, может быть

изучена с помощью электронной микроскопии. Репликация вирусов в КК также обеспечивает получение клинического изолята, который может быть использован для дополнительных исследований, таких как изучение взаимодействия вируса и клеток хозяина, антивирусной активности, серотипирование, эпидемиологическая оценка, а также подробное изучение структуры вируса, стадий и механизмов его репликации.

КК тканей также используются в цитологии, гистологии, физиологии, генной инженерии, онкологии, биотехнологии. В настоящее время открываются новые перспективные возможности использования КК в современных эффективных биомедицинских технологиях. Одним из наиболее перспективных направлений в био- и нанотехнологии является реконструкция различных тканей и органов. В силу ограниченного объема обзора мы охарактеризовали основные возможности использования КК в вирусологии и лишь упомянули биотехнологические и другие перспективные аспекты их применения в медицине.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Davis P.K., Ho A., Dowdy S.F. Biological methods for cell cycle synchronization of mammalian cells. *Bitechniques*. 2001;30(6):1322–31. DOI: <https://doi.org/10.2144/01306rv01>
2. WHO. Use of cell culture in Virology for developing countries in the South-East Asia region;2017.
3. Uysal O., Sevimli T., Sevimli M., et al. Cell and tissue culture: the base of biotechnology. In: Barh D., Azevedo V., eds. *Omic Technologies and Bio-Engineering. Towards Improving Quality of Life. Volume 1*. Elsevier;2018:391–429. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804659-3.00017-8>
4. Hematian A., Sadeghifard N., Mohebi R., et al. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong. Public Health Res. Perspect*. 2016;7(2):77–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>
5. Aarattuthodi S., Dharan V., Koshy M. Fish cell cultures — uses and prospects. *J. Aquac. Res. Dev*. 2021;13:667. DOI: <https://doi.org/10.35248/2155-9546.22.13.667>
6. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Культура диплоидных клеток как объект изучения молекулярных механизмов старения. *Успехи современной биологии*. 1978;85(2):267–83. Gavrilov L.A., Gavrilova N.S. Diploid cell cultures as an object for the study of the molecular mechanisms of aging. *Successes of Modern Biology*. 1978;85(2):267–83.
7. Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Лисаков А.Н. и др. Практические аспекты выявления, культивирования и характеристики изолятов вируса *Varicella-zoster*. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(2):387–96. Nagieva F.G., Barkova E.P., Lisakov A.N., et al. Practical aspects on identification, cultivation and characteristics of *Varicella-zoster* virus isolates. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(2):387–96. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-PAO-1211> EDN: <https://elibrary.ru/ptnvtv>
8. Shridhar Rao P.N. Diploid cells culture. *Microbiol notes*; 2006. URL: http://microrao.com/micronotes/diploid_cell_culture.htm
9. Fletcher M.A. Human diploid cell strains (HDCS) viral vaccines. *Dev. Biol. Stand*. 1998;93:97–107.
10. Петручук Е.М., Шалунова Н.В., Олефир Ю.В. и др. Культуры клеток в заместительной терапии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):197–206. Petruchuk E.M., Shalunova N.V., Olefir Yu.V., et al. Cell cultures in replacement therapy. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):197–206. EDN: <https://elibrary.ru/zxgljp>
11. *Каталог Всероссийской коллекции клеточных культур*. СПб.: Наука; 1991. *Catalog of the Russian Collection of Cell Cultures*. St. Petersburg: Nauka;1991.
12. *Каталог Российской коллекции клеточных культур (ПК-КК)*. Омск;1999. *Catalog of the Russian Collection of Cell Cultures (RKKK)*. St. Petersburg, Omsk;1999.
13. Parodi B. *Human and Animal Cell Lines Catalogue*. Geneva;1993.
14. Dolskiy A.A., Grishchenko I.V., Yudkin D.V. Cell cultures for virology: usability, advantages, and prospects. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21(21):7978. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21217978>
15. Ju X., Zhu Y., Wang Y., et al. A novel cell culture system modeling the SARS-CoV-2 life cycle. *PLoS Pathog*. 2021;17(3):e1009439. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009439>
16. Wu W., Orr-Burks N., Karpilow J., Tripp R.A. Development of improved vaccine cell lines against rotavirus. *Sci. Data*. 2017;4:1–12. DOI: <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.21>
17. Werstuck G., Bilan P., Capone J.P. Enhanced infectivity of herpes simplex virus type 1 viral DNA in a cell line expressing the trans-inducing factor Vmw65. *J. Virol*. 1990;64:984–91. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.64.3.984-991.1990>
18. Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М. и др. Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1, вирусам гриппа птиц, свиней, человека. *Вопросы вирусологии*. 2011;56(6):14–9. Danilenko D.M., Smirnova T.D., Gudkova T.M., et al. Comparative study of the differential susceptibility of different cell lines to pandemic H1N1V influenza viruses and avian influenza, swine influenza, and human influenza viruses. *Problems of Virology*. 2011;56(6):14–9. EDN: <https://elibrary.ru/ooqzsh>
19. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(H1N1) в России. *Вопросы вирусологии*. 2010;55(3):4–9. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., et al. Spread of new pandemic influenza A(H1N1) virus in Russia. *Problems of Virology*. 2010;55(3):4–9. EDN: <https://elibrary.ru/muekip>
20. Захарова Ю.А., Остапчук А.В., Василевский В.В. и др. Характеристика чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к вирусам Coxsackievirus B5 и Herpes simplex virus-1. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):102–10. Zakharova Yu.A., Ostapchuk A.V., Vasilevskiy V.V., et al. Characterisation of new animal cell cultures' sensitivity to Coxsackievirus B5 and Herpes simplex virus-1. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):102–10. DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-15>
21. Chan J.F.W., Yip C.C.Y., Tsang J.O.L., et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: Implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg. Microbes Infect*. 2016;5(8):e93. DOI: <https://doi.org/10.1038/emi.2016.99>
22. Пименова Е.В., Храпова Н.П., Замарина Т.В. Модели *in vitro* для изучения вируса Зика. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(2):159–64. Pimenova E.V., Khrapova N.P., Zamarina T.V. *In vitro* models for the study of Zika virus. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(2):159–64. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-159-164> EDN: <https://elibrary.ru/wltpwu>
23. Dulbecco R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1952;38:747–52. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.38.8.747>

24. Lee J.C., Tseng C., Chen K.J., et al. A cell-based reporter assay for inhibitor screening of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Anal. Biochem.* 2010;403(1-2):52–62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.04.004>
25. Lutz A., Dyall J., Olivo P.D., Pekosz A. Virus-inducible reporter genes as a tool for detecting and quantifying influenza A virus replication. *J. Virol. Methods.* 2005;126(1-2):13–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.016>
26. Kainulainen M.H., Nichol S.T., Albariño C.G., Spiropoulou C.F. Rapid determination of ebolavirus infectivity in clinical samples using a novel reporter cell line. *J. Infect. Dis.* 2017;216:1380–85. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix486>
27. Wang G., Suzutani T., Yamamoto Y., et al. Generation of a reporter cell line for detection of infectious varicella-zoster virus and its application to antiviral studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(9):3142–5. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00342-06>
28. Lee J.C., Chang C.F., Chi Y.H., et al. A reporter-based assay for identifying hepatitis C virus inhibitors based on subgenomic replicon cells. *J. Virol. Methods.* 2004;116(1):27–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.10.007>
29. Felber B.K., Pavlakis G.N. A quantitative bioassay for HIV-1 based on trans-activation. *Science.* 1988;239(4836):184–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.3422113>
30. Kimpton J., Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* 1992;66(4):2232–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.66.4.2232-2239.1992>
31. Froggatt H.M., Heaton B.E., Heaton N.S. Development of a fluorescence-based, high-throughput SARS-CoV-2 3CL^{pro} reporter assay. *J. Virol.* 2020;94(22):e01265–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01265-20>
32. Rawson J.M.O., Duchon A., Nikolaitchik O.A., et al. Development of a cell-based luciferase complementation assay for identification of SARS-CoV-2 3CL^{pro} inhibitors. *Viruses.* 2021;13(2):173. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13020173>
33. Kohl C., Brinkmann A., Dabrowski P.W., et al. Protocol for metagenomic virus detection in clinical specimens. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21(1):48–57. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2101.140766>
34. Hudu S.A., Alshrari A.S., Syahida A., Sekawi Z. Cell culture, technology: enhancing the culture of diagnosing human diseases. *J. Clin. Diagn. Res.* 2016;10(3):DE01–5. DOI: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15837.7460>
35. Hematian A., Sadeghifard N., Mohebi R., et al. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health Res. Perspect.* 2016;7(2):77–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>
36. Dronina J., Samukaite-Bubniene U., Ramanavicius A. Advances and insights in the diagnosis of viral infections. *J. Nanobiotechnology.* 2021;19(1):348. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01081-2>
37. Демидова Н.А., Климова Р.Р., Куц А.А. и др. Получение и характеристика моноклональных антител к G-белку респираторно-синцитиального вируса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020;97(1):7–14. Demidova N.A., Klimova R.R., Kushch A.A., et al. Obtaining and characterization of the monoclonal antibodies against G-protein of the respiratory syncytial virus. *Journal of microbiology epidemiology and immunobiology.* 2020;97(1):7–14. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-7-14> EDN: <https://elibrary.ru/fxehevq>
38. Leland D.S., Ginocchio C.C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20(1):49–78. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-06>
39. Genzel Y. Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand? *Biotechnol. J.* 2015;10(5):728–40. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201400388>
40. Graham B.S. Advances in antiviral vaccine development. *Immunol. Rev.* 2013;255(1):230–42. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12098>
41. Varan G., Unal S. Three-dimensional cell culture methods in infectious diseases and vaccine research. *Future Pharmacol.* 2023;3(1):48–60. DOI: <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol3010004>
42. Миронова Л.Л. Разные аспекты применения культур клеток в вакцинологии. *Фундаментальные исследования.* 2009;(9):60–2. Mironova L.L. Different aspects of the use of cell cultures in vaccinology. *Fundamental Research.* 2009;(9):60–2. EDN: <https://elibrary.ru/kxpxzdx>
43. Бархалёва О.А., Ладыжинская И.П., Воробьёва М.С. и др. «Витагерпавак» — первая отечественная вакцина на перевиваемой линии клеток Vero (B). *Вопросы вирусологии.* 2009;54(5):33–7. Barkhaleva O.A., Ladyzhinskaya I.P., Vorob'eva M.S., et al. Vitaherpavac is the first Russian herpes simplex virus vaccine obtained on the Vero B continuous cell line. *Problems of Virology.* 2009;54(5):33–7. EDN: <https://elibrary.ru/lajyjb>
44. Fang Z., Lyu J., Li J., et al. Application of bioreactor technology for cell culture-based viral vaccine production: present status and future prospects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022;10:921755. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.921755>
45. Andersen P.I., Ianevski A., Lysvand H., et al. Discovery and development of safe-in-man broad-spectrum antiviral agents. *Int. J. Infect. Dis.* 2020;93:268–76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.018>
46. Bojkova D., Reus P., Panosch L., et al. Identification of novel antiviral drug candidates using an optimized SARS-CoV-2 phenotypic screening platform. *iScience.* 2023;26(2):105944. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.105944>
47. Dittmar M., Lee J.S., Whig K., et al. Drug repurposing screens reveal cell-type-specific entry pathways and FDA-approved drugs active against SARS-CoV-2. *Cell Reports.* 2021;35(1):108959. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108959>
48. Kumar S., Sarma P., Kaur H., et al. Clinically relevant cell culture models and their significance in isolation, pathogenesis, vaccine development, repurposing and screening of new drugs for SARS-CoV-2: a systematic review. *Tissue Cell.* 2021;70:101497. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101497>
49. Krylova N.V., Silchenko A.S., Pott A.B., et al. In vitro anti-orthohantavirus activity of the high- and low-molecular-weight fractions of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens*. *Mar. Drugs.* 2021;19(10):577. DOI: <https://doi.org/10.3390/md19100577>
50. Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Федотов А.Ю. и др. Перспективная культуральная модель для контроля биологической активности интерферонов человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2015;92(5):39–44. Nagieva F.G., Barkova E.P., Fedotov A.Yu., et al. A perspective cultural model for control of biological activity of human interferons. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2015;92(5):39–44. EDN: <https://elibrary.ru/zqjydr>
51. Алпатова Н.А., Гайдерова Л.А., Яковлев А.К. и др. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2017;17(1):13–26. Alpatova N.A., Gayderova L.A., Yakovlev A.K., et al. Assessment of biotechnological products specific activity. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2017;17(1):13–26. EDN: <https://elibrary.ru/yhssgl>

ОБЗОРЫ

52. Emeny J.M., Morgan M.J. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* 1979;43(1):247–52.
DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>
53. Pires De Souza G.A., Le Bideau M., Boschi C., et al. Choosing a cellular model to study SARS-CoV-2. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:1003608.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1003608>
54. Spiegel M., Weber F. Inhibition of cytokine gene expression and induction of chemokine genes in non-lymphatic cells infected with SARS coronavirus. *Virol. J.* 2006;3:17.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-17>
55. Dolci M., Signorini L., D’Alessandro S., et al. In vitro SARS-CoV-2 infection of microvascular endothelial cells: effect on pro-inflammatory cytokine and chemokine release. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(7):4063.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23074063>
56. Волкова И.М., Коровина Д.Г. Трёхмерные матрицы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии. *Биотехнология.* 2015;31(2):8–26. Volkova I.M., Korovina D.G. Three-dimensional matrixes of natural and synthetic origin for cell biotechnology. *Biotechnology.* 2015;31(2):8–26.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683815090082>
EDN: <https://elibrary.ru/vajqzx>
57. Бобринетский И.И., Морозов Р.А., Селезнёв А.С. и др. Исследование пролиферативной активности и жизнеспособности клеток фибробласта и глиобластомы на различных типах углеродных нанотрубок. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2012;153(2):227–31. Bobrinetsky I.I., Morozov R.A., Seleznev A.S., et al. Proliferative activity and viability of fibroblast and glioblastoma cell on various types of carbon nanotubes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2012; 153(2):259–62.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1690-z>
EDN: <https://elibrary.ru/dzkwco>
58. Kuznetsova T.A., Andryukov B.G., Besednova N.N., et al. Marine algae polysaccharides as basis for wound dressings, drug delivery, and tissue engineering: a review. *J. Mar. Sci. Eng.* 2020;8(7):481. DOI: <https://doi.org/10.3390/jmse8070481>
EDN: <https://elibrary.ru/xevoja>
59. Volarevic V., Markovic B.S., Gazdic M., et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *Int. J. Med. Sci.* 2018;15(1):36–45. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>
60. Ghaedi M., Niklason L.E. Human Pluripotent Stem Cells (iPSC) generation, culture, and differentiation to lung progenitor cells. In: Turksen L., ed. *Organoids. Methods in Molecular Biology, Volume 1576.* New York;2019:55–92.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9811-1_11
61. Song W.K., Park K.M., Kim H.J., et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem. Cell Rep.* 2015;4(5):860–72.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.005>

Информация об авторах

Кузнецова Татьяна Алексеевна[✉] — д.м.н., г.н.с. лаб. диагностических препаратов, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, takuznets@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>

Беседнова Наталья Николаевна — д.м.н., проф., академик РАН, г.н.с. лаб. диагностических препаратов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>

Алиев Максим Романович — лаборант-исследователь лаб. диагностических препаратов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1676-1405>

Щелканов Михаил Юрьевич — д.б.н., директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Участие авторов: Кузнецова Т.А. — разработка концепции, поисково-аналитическая работа, подготовка статьи; Беседнова Н.Н., Щелканов М.Ю. — разработка концепции; Алиев М.Р. — поисковая работа, подготовка статьи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 03.11.2023;
принята к публикации 20.12.2023;
опубликована 28.02.2024

Information about the authors

Tatyana A. Kuznetsova[✉] — D. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of diagnostic preparates, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, takuznets@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>

Natalia N. Besednova — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, main researcher, Laboratory of diagnostic preparates, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>

Maxim R. Aliev — laboratory researcher, Laboratory of diagnostic preparates, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1676-1405>

Michail Yu. Shchelkanov — D. Sci. (Biol.), Director, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Author contribution: Kuznetsova T.A. — concept development; search and analytical work, article preparation; Besednova N.N., Shchelkanov M.Yu. — concept development; Aliev M.R. — search work, article preparation. All authors made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 03.11.2023;
accepted for publication 20.12.2023;
published 28.02.2024

НЕКРОЛОГ



Памяти Бориса Савельевича Народицкого (20 сентября 1941 года – 10 января 2024 года)



Не стало Бориса Савельевича Народицкого. Он ушёл после тяжёлой болезни на 83-м году жизни. Главный научный сотрудник, заведующий отделом генетики и молекулярной биологии бактерий Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, заместитель директора по научной работе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, доктор биологических наук, профессор, лауреат премии Совета Министров СССР.

В телеграмме соболезнования, направленной Министром здравоохранения Российской Федерации М.А. Мурашко, Борис Савельевич Народицкий назван человеком, вся жизнь и трудовая деятельность которого были примером высокого профессионализма и верности медицинской науке.

С именем Бориса Савельевича связаны первые в России исследования по созданию и использованию аденовирусных векторов в целях генной терапии и разработки вакцинных препаратов. Венцом этих многолетних исследований стало создание под его руководством универсальной технологической платформы рекомбинантных аденовирусных векторов, реализованной в разработке на её основе вакцины против геморрагической лихорадки Эбола и первой в мире вакцины против новой коронавирусной инфекции «Спутник V».

Благодаря пионерским исследованиям Б.С. Народицкого были отработаны технологии направленной модификации вирусных векторов, позволяющей осуществлять тканеспецифическую доставку и экспрессию генетической информации в клетках. Результаты сформировали основу для разработки

принципиально новых вакцин против гриппа, бешенства, сибирской язвы, туберкулёза, средств на основе мини-антител для пассивной иммунизации против вирусных и бактериальных инфекций, препаратов для лечения бокового амиотрофического склероза, хронической ишемии нижних конечностей, токсических состояний, вызываемых химиотерапией. Многочисленные решения учёного в области создания векторных систем доставки генетической информации служат сегодня фундаментом технологии полномасштабного фармацевтического производства, направленного на выпуск новых иммунобиологических препаратов, которые, как, например, вакцины против оболочечных РНК-содержащих вирусов, могут создаваться в кратчайшие сроки.

Борис Савельевич родился 20 сентября 1941 г. в Свердловске, в 1963 г. окончил Московский государственный педагогический институт им. В.И. Ленина по специальности «биология и химия», в 1969 г. под руководством профессора Т.И. Тихоненко в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР защитил кандидатскую диссертацию, в 1989 г. ему присуждена учёная степень доктора биологических наук, в 1994 г. присвоено учёное звание профессора.

Трудовой и творческий путь Бориса Савельевича включал многие годы работы в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР и ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии. В Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России он работал с 2002 г., с 2004 по 2017 г. был заместителем директо-

ра центра по научной работе. До самого последнего времени осуществлял научное руководство основными направлениями исследований лабораторий, использующих в своей работе аденовирусные векторы. Ему принадлежит более 200 научных трудов, включая 2 монографии, 15 авторских свидетельств и более 60 патентов на изобретения, 6 из которых включены в перечни «100 лучших изобретений России» и «10 лучших изобретений России». Работы отмечены дипломом премии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН и премией «Призвание».

Заслуги Бориса Савельевича Народицкого перед отечественной медицинской наукой и здравоохранением отмечены орденом Почёта, медалями «За заслуги перед отечественным здравоохране-

нием» и «В память 850-летия Москвы», Почётной грамотой Минздравсоцразвития России, благодарностью Министра здравоохранения Российской Федерации.

Будучи по призванию педагогом и наставником, отличаясь глубокими знаниями, богатым опытом и несомненными лидерскими качествами, Борис Савельевич воспитал плеяду талантливых молодых специалистов, которые смогут достойно продолжить дело своего выдающегося учителя.

*Коллектив Национального
исследовательского центра эпидемиологии
и микробиологии имени почётного академика
Н.Ф. Гамалеи, редакционная коллегия ЖМЭИ*

ИНФОРМАЦИЯ

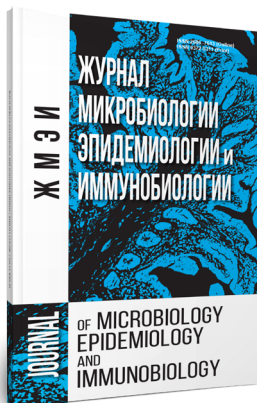
ВСЕРОССИЙСКОГО НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

План заседаний Секции вирусологии Московского отделения Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов на I полугодие 2024 года

Место проведения:

конференц-зал Института вирусологии им. Д.И. Ивановского
ФГБУ «Национальный научно-исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16, тел.: +7 (499) 190 30 59

- 14 февраля 2024 г.
начало в 13:00
- Новый взгляд на вирус гепатита С и возможность ограничения вирусного гепатита С**
Докладчик: Николаева Л.И. — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
- 13 марта 2024 г.
начало в 13:00
- Эпидемиологически значимые респираторные вирусные патогены**
Докладчик: Бурцева Е.И. — доктор медицинских наук, руководитель лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
- 3 апреля 2024 г.
начало в 13:00
- Особенности современной таксономии вирусов**
Докладчик: Альховский С.В. — член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, руководитель лаборатории биотехнологии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
- 22 мая 2024 г.
начало в 13:00
- Математическое моделирование в эпидемиологии. Многолетний опыт и направления развития в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи**
Докладчик: Асатрян М.Н. — доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России



Печатная версия «Журнала микробиологии,
эпидемиологии и иммунологии»
распространяется по подписке:

ГК «Урал-Пресс»

Подписной индекс: **71436.**

Подписка на любое количество номеров.

Сайт: www.ural-press.ru

Контакты: +7(343)262-65-43, info@ural-press.ru