

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](http://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](mailto: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](mailto: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<sup>1/8</sup>. Тираж 158 экз.  
Усл.-печ. л. 19,5.

Отпечатано в «Объединенный  
полиграфический комплекс».  
115114, Москва, Дербеневская  
набережная, 7с2.  
E-mail: [info@opk.bz](mailto:info@opk.bz). [www.opk.bz](http://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. Иванковского 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](http://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@pccr.ru](mailto:crie@pccr.ru)

#### EDITORIAL OFFICE:

5A, Maly Kazenny per.,  
Moscow, 105064, Russia.  
Tel.: +7(925)011-87-79.  
E-mail: [jmei@crie.ru](mailto: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<sup>1/8</sup>.

Circulation 158 copies.

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

E-mail: [info@opk.bz](mailto:info@opk.bz). [www.opk.bz](http://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. Lukashev**, 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

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

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

## 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. Vladimirsky 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
<b>Зверев В.В.</b> 100 лет «Журналу микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» .....	9
<b>Брико Н.И., Соколова Т.В.</b> Жизнь — в профессии, профессия — в жизни (к 120-летию со дня рождения профессора И.И. Ёлкина).....	11

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

<b>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.</b> Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19* .....	19
<b>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.</b> Однократная интраназальная иммунизация аттенуированным Ухань-подобным SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную перекрестную защиту от заражения вариантами Delta и Omicron* .....	36
<b>Волкова Н.А., Михеева И.В., Мельникова А.А., Акимкин В.Г.</b> Ретроспективная оценка результатов иммунодиагностики туберкулеза у детей* .....	52
<b>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.</b> Вариабельность rgeCore/Core-региона вируса гепатита В у беременных женщин в Гвинейской Республике* .....	61
<b>Макарова М.А., Матвеева З.Н., Кафтырева Л.А.</b> Интегративный подход к оценке патогенного потенциала штаммов <i>Escherichia coli</i> , выделенных из мочи* .....	72
<b>Мионов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Платонов А.Е.</b> Схема мультилокусного секвенирования-типирования для характеристики <i>Borrelia miyamotoi</i> — возбудителей безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза* .....	80
<b>Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Баязитова Л.Т., Хусаинова Р.М., Чазова Т.А., Тюпкина О.Ф., Никитина Е.В., Цветкова И.А.</b> Характеристика бактерионосительства <i>Streptococcus pneumoniae</i> в детской популяции* .....	89
<b>Питерский М.В., Ходаков О.А., Михеева Т.В., Билалова Н.В., Конькова-Рейдман А.Б., Захарова Ю.А., Семенов А.В.</b> Филогенетическое положение и генетические особенности вируса иммунодефицита человека-1 в центральной нервной системе* .....	100
<b>Топорков А.В., Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Бородай Н.В., Молчанова Е.В., Бондарева О.С., Антонов А.С.</b> Изучение особенностей циркуляции и свойств вируса Западного Нила в России в 2022 году* .....	114
<b>Левина А.С., Репкова М.Н., Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Мазуркова Н.А., Зарытова В.Ф.</b> Наноконпозиты, состоящие из наночастиц диоксида титана, антисмысловых олигонуклеотидов и фотоактивируемых групп, как агенты для эффективного воздействия на нуклеиновые кислоты.....	127
<b>Давуд Али А.</b> Подавление протеомной активности, связанной с пациентами с COVID-19, страдающими астмой, на основе паттерна экспрессии генов.....	133
<b>ОБЗОРЫ</b>	
<b>Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Алиев М.Р., Щелканов М.Ю.</b> Клеточные культуры в вирусологии: от прошлого к будущему .....	143
<b>НЕКРОЛОГИ</b>	
Памяти Бориса Савельевича Народицкого (20 сентября 1941 года – 10 января 2024 года) .....	154
<b>Информация Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов .....</b>	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
<b>Zverev V.V.</b> 100 years of the Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.....	9
<b>Briko N.I., Sokolova T.V.</b> Life is in profession, profession is in life (to the 120 <sup>th</sup> anniversary of Professor I.I. Elkin).....	11

### ORIGINAL RESEARCHES

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



Коллективу «Журнала микробиологии,  
эпидемиологии и иммунологии»

Дорогие друзья!

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

Основанный в 1924 году, журнал рассматривает актуальные проблемы мировой науки в области эпидемиологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии, 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 иммунологии»



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

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. Гартон, 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 иммунологии» (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 120<sup>th</sup> 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 120<sup>th</sup> 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).

Остановившись 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 1<sup>st</sup> 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 военнопленных 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**<sup>✉</sup> — 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](mailto: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**<sup>✉</sup> — 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](mailto: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

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

<sup>2</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия;

<sup>3</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия;

<sup>4</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае, Владивосток, Россия;

<sup>5</sup>Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия;

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

<sup>7</sup>Медицинское 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 (XBB.1.9.2 и XBB.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., 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. *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>

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. Popova<sup>1</sup>, Mikhail Yu. Shchelkanov<sup>2,3✉</sup>, Natalia V. Krylova<sup>2,3</sup>, Alexey A. Belik<sup>2</sup>, Lyubov M. Semeikina<sup>2,4</sup>, Tatyana S. Zaporozhets<sup>2</sup>, Vyacheslav Yu. Smolenskiy<sup>1</sup>, Elena V. Persianova<sup>2</sup>, Marina N. Prosyannikova<sup>4</sup>, Yuriy A. Belov<sup>2,3</sup>, Olga V. Iunikhina<sup>2,3</sup>, Anastasiya B. Pott<sup>2</sup>, Tatyana F. Khomichuk<sup>4</sup>, Anna I. Simakova<sup>5</sup>, Svetlana A. Abramova<sup>2</sup>, Olga B. Romanova<sup>4</sup>, Tatyana N. Detkovskaya<sup>6</sup>, Sergey P. Kryzhanovskiy<sup>7</sup>, **Natalia N. Besednova<sup>2,7</sup>**

<sup>1</sup>Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia;

<sup>3</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia;

<sup>4</sup>Center for Hygiene and Epidemiology in Primorsky Krai;

<sup>5</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia;

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

<sup>7</sup>Medical 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>

## Введение

Коронавирусное заболевание 2019 г. (Coronavirus disease 2019 — COVID-19) этиологически связано с коронавирусом тяжёлого острого респираторного синдрома 2-го типа (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 — SARS-CoV-2; Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) [1, 2] и возникло в результате преодоления возбудителем межвидового барьера и проникновения из популяций летучих мышей (*Chiroptera*, *Microchiroptera*) в человеческую популяцию [3, 4]. COVID-19 вызвал наиболее продолжительную (11.03.2020–05.05.2023, или 1150 дней), наиболее масштабную (свыше 750 млн подтверждённых случаев) и одну из самых смертоносных (порядка 6 млн летальных исходов) пандемий острого респираторного заболевания в истории человечества [3, 5]. Пандемия COVID-19 стала первой, связанной с коронавирусом рукокрылых (*Chiroptera*) [1, 6] — второго по массовости после грызунов отряда млекопитающих, обладающих рядом уникальных эволюционных особенностей [7–9], эпидемиологическое значение которых стало понятно лишь в начале XXI в. после эпидемий, вызванных коронавирусами тяжёлого острого респираторного синдрома (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) [1, 10] и Ближневосточного респираторного синдрома (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Merbecovirus*) [11, 12].

Пандемия COVID-19 стимулировала широкое внедрение молекулярно-генетических [13, 14] и информационных [15, 16] технологий в практику противоэпидемических мероприятий. В условиях деградации широких международных связей в начале 2020-х гг., усугубившейся пандемией, и падения авторитета международных организаций, включая Всемирную организацию здравоохране-

ния (ВОЗ), Российская Федерация была вынуждена развернуть собственную национальную платформу молекулярно-генетических данных — Virus genome aggregator of Russia (VGARus), разработанную Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). VGARus была введена в эксплуатацию на базе Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора Распоряжением Правительства РФ № 448 от 23.03.2021. К концу 2023 г. в системе зарегистрировано более 150 организаций, осуществляющих её пополнение; в базе данных содержится свыше 300 тыс. нуклеотидных последовательностей SARS-CoV-2, из которых более половины — полноразмерные вирусные геномы [14, 17]. Таким образом, в отличие даже от последней пандемии гриппа А (H1N1 pdm09) (Articulavirales: Orthomyxoviridae, *Alphainfluenzavirus*) (2009–2010 гг.) [18], когда молекулярно-генетические методы активно использовались для контроля инфекционного процесса, пандемия COVID-19 стала первым глобальным эпидемическим процессом, который детально характеризовался с помощью данных полногеномного секвенирования «в режиме реального времени» (по крайней мере — в развитых странах) [14, 17, 19].

Россия, имеющая самую большую в мире территорию, обладает колоссальным региональным разнообразием природно-климатических и социально-демографических условий, что необходимо учитывать в процессе эпидемиологического анализа динамики инфекционных заболеваний. Например, Приморский край (ПК), расположенный на крайнем юге российского Дальнего Востока (практически — на широте Крымского полуострова), характеризуется уникальным муссонным умеренным климатом, формируемым широтной климатической аномалией

вследствие проникновения из Татарского пролива холодного Приморского течения. ПК обеспечивает удобный выход через незамерзающие порты (Владивосток, Восточный, Зарубино, Находка, Посыет) к динамично развивающемуся Азиатско-Тихоокеанскому региону и традиционно тесно связан с северо-восточными провинциями Китайской Народной Республики всеми видами транспорта. Административный центр ПК Владивосток, являющийся столицей Дальневосточного федерального округа, хорошо узнаваем как в России, так и за её пределами благодаря статусу свободного порта и наличию одного из крупнейших в азиатской части страны Дальневосточного федерального университета.

**Цель работы** — молекулярно-генетический анализ закономерностей развития эпидемического процесса COVID-19 на территории ПК в период пандемии этого заболевания (2020–2023 гг.).

### Материалы и методы

**Назофарингеальные смывы** для проведения ПЦР-тестирования и получения вирусных штаммов отбирали у лиц, проживавших на территории ПК. Отбор биологического материала осуществлялся квалифицированным персоналом, прошедшим предварительное обучение и регулярную проверку навыков на риноларингологических симуляторах [20, 21]. 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).

**Индикация РНК SARS-CoV-2** осуществлялась с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ): выделение РНК проводили с использованием комплекса реагентов «М-Сорб-НК» (НПФ «Синтол») ручным способом или (при больших количествах образцов) на автоматической станции «AutoPure 96» («Hangzhou Allsheng Instruments Co.»), набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» (НПФ «Синтол»). Положительные образцы, предназначенные для последующего использования в исследовательских целях, хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$  без разрыва холодовой цепи.

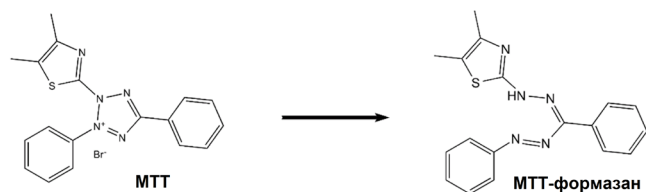
**Секвенирование полноразмерного генома SARS-CoV-2** проводили для положительных образцов с пороговым циклом при первичном ПЦР-тестировании  $C_t \leq 25$  на технологической платформе Nanopore [22, 23] согласно протоколу ARTIC SARS-CoV-2 v3: обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора «Midnight RT-PCR Expansion»; ампликоны получали и кодировали с использованием 29 пар перекрывающихся праймеров и «Rapid Barcoding Kit 96» (SQK-RBK110.96); очистку кДНК проводили на магнитных частицах «AMPure XP beads»; полученные геномные библиотеки секвенировали на приборе «MinION» с использованием

ячеек «FLO-MIN106 R9.4.1» («Oxford Nanopore Technologies»). Полученные данные в формате FAST5 (программный пакет «MinKNOW» переводили в формат FASTQc помощью программы «Guppy v. 6.3.8»). Сборку геномов SARS-CoV-2 в формате FASTA проводили путём выравнивания относительно референсных последовательностей из VGARus с использованием программного пакета «Epi2me v. 22» и модуля «ARTIC v. 1». Для оценки качества собранных последовательностей и распределения геномов по линиям использовали сервисы «Nextclade» и «Pangolin COVID-19 Lineage Assigner v. 4.3». Последовательности, в которых количество нераспознанных или неоднозначных нуклеотидов составляло более 10% полногеномной последовательности SARS-CoV-2, были исключены из выборки для анализа.

**Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей** проводили после множественного выравнивания с использованием программы «MAFFT v. 7.475» методом «ближайших соседей» [24] средствами программного пакета «MEGA v. 11.0.13» при уровне bootstrap-поддержки в 1000 повторов. Визуализацию полученных данных осуществляли с помощью сервиса «iTOL v. 6».

**Изоляция штаммов SARS-CoV-2** проводилась из ОТ-ПЦР-РВ-положительных образцов назофарингеальных смывов, осветлённых низкоскоростным центрифугированием и фильтрованных через насадки «Millex» («Merck») с диаметром пор 0,22 мкм, на модели клеточной линии Vero E6 (почки африканской зелёной маргаритки), которую культивировали в пластиковых пробирках («Nunc») со скошенным дном площадью 5,5 см<sup>2</sup> в среде DMEM («БиолоТ») с добавлением 1% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко»), 100 ЕД/мл гентамицина при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> [25, 26]. Эффективность изоляции вируса оценивали по снижению порогового цикла ПЦР в 3 последовательных пассажах. На 5-е сутки после инфицирования культуральную жидкость отбирали для постановки ОТ-ПЦР-РВ (после 3-го пассажа дополнительно проводили определение Ig 50% инфекционной дозы тканевой культуры (Ig TCID<sub>50</sub>) с помощью МТТ-теста).

**МТТ-тест** использовали для оценки выживаемости клеток Vero E6 под действием различных разведений вируса при оценке инфекционного титра штаммов SARS-CoV-2 после 3-го пассажа. Сущность этого метода заключается в способности жизнеспособных клеток превращать хорошо растворимый жёлтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в нерастворимые внутриклеточные кристаллы (E,Z)-5-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-1,3-дифенилформазана (МТТ-формаза) под действием внутриклеточных дегидрогеназ [27, 28]:



На 5-е сутки после заражения в лунки с клетками 96-луночного планшета («Merck») добавляли по 20 мкл раствора 5 мг/мл МТТ («Sigma-Aldrich»); инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч; после удаления культуральной жидкости в лунки вносили по 150 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,4 М HCl; оптическую плотность в лунке определяли при 540 нм (вблизи максимума поглощения МТТ-формаза) с вычетом фонового значения при 620 нм с помощью планшетного ридера («Labsystems»). Уровень цитопатогенности (cytopathogenicity level — CPL) штамма в конкретном разведении вычисляли по формуле:

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

где  $D_v$  — оптическая плотность инфицированного образца;  $D_0$  — оптическая плотность неинфицированной клеточной культуры.

**Инфекционный титр** штамма определяли как предельное разведение исходной вирусосодержащей жидкости, зафиксированное в эксперименте, для которого  $CPL > 0$  (неравенство нулю оценивалось в  $t$ -тесте Стьюдента при уровне значимости  $p = 95\%$  и 8-кратных повторях каждого разведения вирусосодержащей жидкости).

**Эпидемиологический анализ** заболеваемости COVID-19 в ПК с 20.04.2020 по 30.06.2023 проводили на основе данных Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае<sup>1</sup>, в России — по данным официального сайта Роспотребнадзора<sup>2</sup> и российского информационного портала «Стопкоронавирус»<sup>3</sup>. Использовали информацию о распространении генетических вариантов SARS-CoV-2 на территории России из обзорно-аналитической работы [17, 19] и российской базы данных VGARus, в странах Восточной Азии — из международной базы данных GISAID<sup>4</sup>.

**Статистическую обработку данных** осуществляли с помощью следующих функций из программного пакета «MS Excel 2010»: объём анализи-

руемой выборки ( $n$ ); среднее арифметическое ( $M$ ); стандартная ошибка среднего ( $m$ ); медиана ( $Me$ ); нижний (25%) квартиль ( $LQ$ ); верхний (75%) квартиль ( $UQ$ ); интерквартильный размах ( $LQ-UQ$ ). Нормальность распределения количественных признаков проверяли с использованием  $W$ -критерия Шапиро–Уилка;  $t$ -критерия Стьюдента (при уровне значимости альтернативной гипотезы  $p = 0,05$ );  $U$ -критерия Манна–Уитни [29, 30].

**Метод главных компонент** как способ поиска подпространства меньшей размерности, в проекции на которое исходные данные имеют наименьший разброс квадратичных отклонений [31, 32], применяли с помощью программных пакетов «Statistica v. 7.0» («StatSoft Inc.») и «Mathworks Matlab R2007b» («MathWorks Inc.»).

## Результаты

**Индикация РНК SARS-CoV-2** в назофарингеальных смывах в период пандемии COVID-19 на территории ПК проводилась в 24 лабораториях (в том числе 5 частных): было проведено 3 007 009 ОТ-ПЦР-РВ-тестирований, из которых 399 821 (13,3%) оказались положительными<sup>5</sup>. Получаемая информация интегрировалась для оперативного анализа в эпидемиологических подразделениях Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае и Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю.

**Полногеномные нуклеотидные последовательности SARS-CoV-2**, полученные из образцов биологического материала, собранного на территории ПК в период пандемии COVID-19, представлены в табл. 1. Помимо 553 геномов, секвенированных в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова в рамках реализации Федерального проекта «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья», ещё 502 генома секвенированы в других научных учреждениях, в которые были направлены ОТ-ПЦР-РВ-положительные образцы из Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае в соответствии с Приказом Роспотребнадзора<sup>6</sup>.

**Результаты филогенетического анализа** полноразмерных геномов SARS-CoV-2 с территории ПК (табл. 1), представленные на рис. 1, а, сви-

<sup>1</sup> Отчётная форма Роспотребнадзора № 970 «Информация о случаях заболевания лиц с подозрением на коронавирусную инфекцию», отчёт № 1076 «Сводный отчет о случаях COVID-19 в регионах».

<sup>2</sup> URL: [https://www.rosпотребнадзор.ru/region/korono\\_virus/epid.php](https://www.rosпотребнадзор.ru/region/korono_virus/epid.php)

<sup>3</sup> URL: <https://стопкоронавирус.рф/>

<sup>4</sup> URL: <https://gisaid.org>

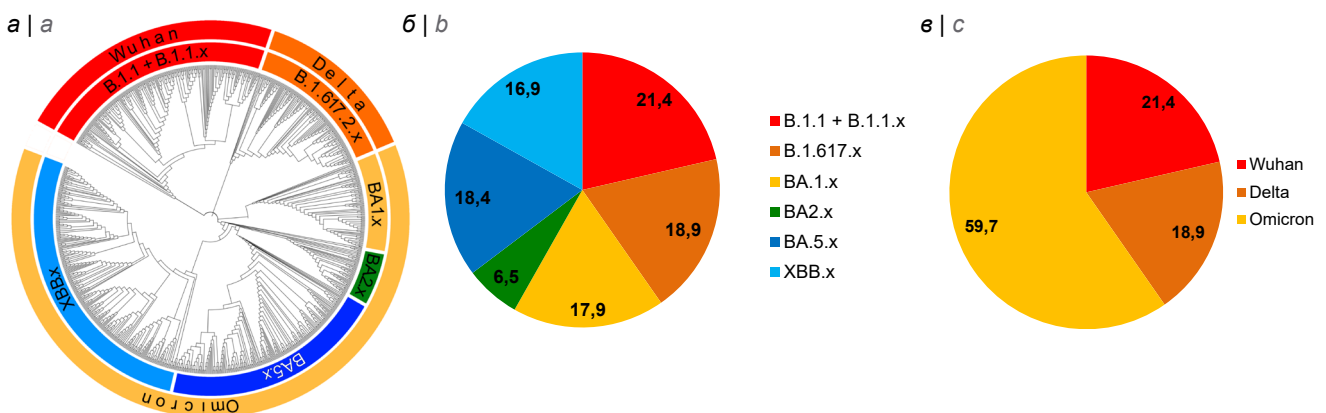
<sup>5</sup> Количество ОТ-ПЦР-РВ-положительных проб не следует ассоциировать с количеством пациентов с COVID-19: в 2020 г. больные обследовались в среднем 3,6 раза, т.к. в то время из лечебного учреждения выписывали после получения двукратного отрицательного результата, который достигался не с первого раза; в 2021 г. выписка стала производиться при получении однократного отрицательного результата, а позже — по факту выздоровления.

<sup>6</sup> Приказ Роспотребнадзора от 19.02.2021 № 56 «О совершенствовании молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции».



**Таблица 1.** Число полногеномных последовательностей SARS-CoV-2, обнаруженных на территории ПК в 2020–2023 гг., в базе данных VGARus**Table 1.** Data on full-genome sequences of SARS-CoV-2 detected in the territory of Primorsky Krai (2020–2023) in the VGARus database

Год Year	НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (Владивосток) G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (Vladivostok)	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск) State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (Novosibirsk)	НИИ гриппа (Санкт-Петербург) Institute of Influenza (St.-Petersburg)	Всего Total
2020	173	2	23	198
2021	90	11	1	102
2022	105	158	306	569
2023	185	0	1	186
Итого   Total	553	171	331	1055

**Рис. 1.** Генотипирование 804 полногеномных нуклеотидных последовательностей SARS-CoV-2, выявленных в ПК в 2020–2023 гг.

а — филогенетическое древо; б — распределение по генетическим линиям Pango; в — распределение по геновариантам ВОЗ.

**Fig. 1.** Genotyping of 804 full-genome SARS-CoV-2 nucleotide sequences identified in Primorsky Krai (2020–2023).

а — phylogenetic tree; б — distribution according to Pango genetic lines; в — distributions according to WHO genovariants.

детельствуют о дифференцировке на геноварианты по классификации Pango (рис. 1, б) и ВОЗ (рис. 1, в).

**Эпидемическая динамика COVID-19** в связи со сменой геновариантов SARS-CoV-2 на территории ПК (2020–2023 гг.) представлена в **табл. 2** и на **рис. 2**: как и в целом по России, подъём заболеваемости COVID-19 за период пандемии этого заболевания (11.03.2020–05.05.2023), начавшийся с крупных мегаполисов [17, 19], имел выраженный волнообразный характер с 7 эпидемическими периодами.

В ПК первый случай COVID-19 был зарегистрирован 21.03.2020 (женщина 30 лет, гражданка России, проживающая во Владивостоке, вернувшаяся 15.03.2020 из служебной командировки в Мексику, г. Канкун), и на 05.05.2023 документировано 217 196 случаев этого заболевания.

В целом динамика эпидемического процесса в регионе соответствовала таковой в среднем по России (рис. 2, табл. 2), но с некоторым запаздыванием (примерно на 2 нед) по сравнению с центральными регионами страны (аналогично тому, как это имело место при распространении пандемического грип-

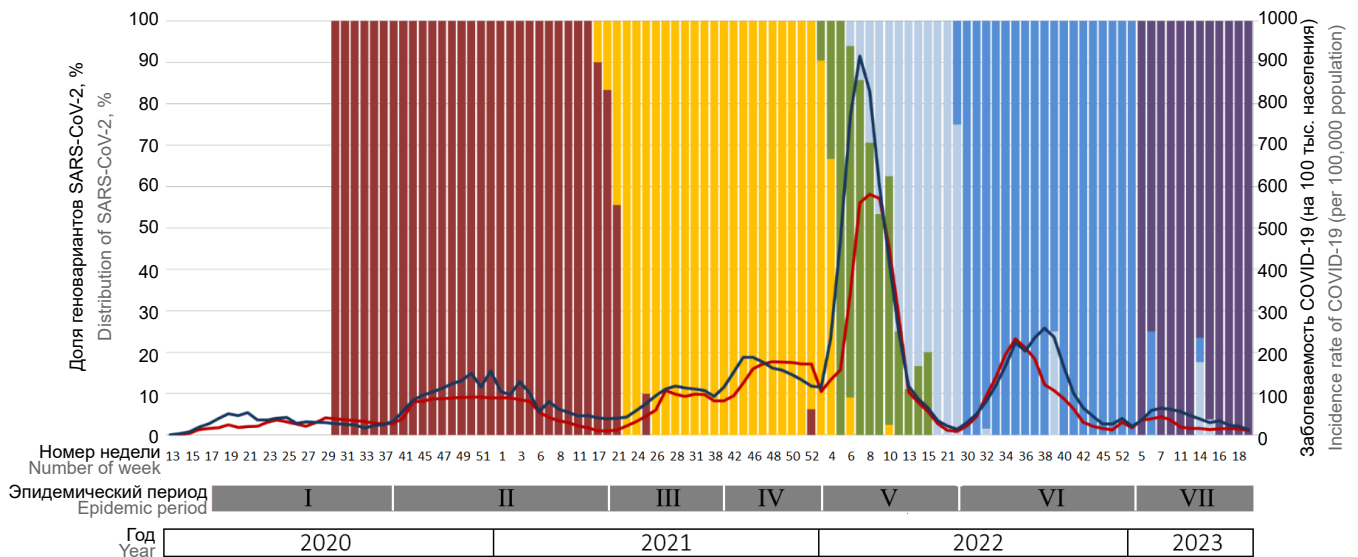
па А (H1N1 pdm09) [18]). Первый подъём заболеваемости COVID-19 в ПК характеризовался медленным нарастанием в течение 13 нед с пиком на 29-й неделе. В России этот процесс развивался более быстрыми темпами — пик заболеваемости был зарегистрирован уже через 5 нед от начала подъёма с локальным максимумом через 19 нед. Более медленное развитие эпидемического роста в ПК было обусловлено в первую очередь введением строгих режимно-ограничительных мероприятий. В этот период в России от больных COVID-19 выделяли в основном Ухань-подобные (Wuhan) варианты возбудителя: В.1.1 (62,0%), В.1.1.317 (3,3%). В ПК большинство геновариантов вируса также относились к линиям В.1.1 (26%) и В.1.1.x (В.1.1.317 и В.1.1.277.2) — 74% (рис. 2, **табл. 3**).

Во время II волны рост заболеваемости как в ПК, так и в среднем по России был более медленным — 11 и 17 нед с пиками на 50-й и 52-й неделях соответственно. Доля В.1.1 в России снизилась до 33,7%, а доля В.1.1.317 и В.1.1.523 увеличилась до 21,3%; появились новые геноварианты: Alpha

**Таблица 2.** Динамика эпидемии COVID-19 в ПК в сравнении с Россией в целом в 2020–2023 гг.  
**Table 2.** Characteristics of epidemic dynamics of COVID-19 in Primorsky Krai in comparison with a whole Russian Federation (2020–2023)

Период Period	Территория Territory	Сроки эпидемических периодов Dates of epidemic periods				Заболеемость на 100 тыс. населения Incidence (per 100 000 population)							Клиническая форма Clinical form					
		начало   beginning		конец   end		продолжительность, недели duration, weeks	заболеваемость в начале периода incidence in the beginning of the period	заболеваемость в конце периода incidence in the end of the period	максимум maximum	M	m	Me	LQ	UQ	общее число случаев total number of incidences	тяжёлая, % severe, %	средней тяжести, % average severity, %	лёгкая и бессимптомная, % mild and asymptomatic, %
		дата date	номер недели number of a week	дата date	номер недели number of a week													
I	ПК   РК	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
	РФ   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	ПК   РК	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
	РФ   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	ПК   РК	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
	РФ   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	ПК   РК	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
	РФ   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	ПК   РК	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
	РФ   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	ПК   РК	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
	РФ   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	ПК   РК	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
	РФ   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	–	–	–

**Примечание.** РФ — Российская Федерация; «–» — нет данных.  
**Note.** РК — Primorsky Krai; RF — Russian Federation; “–” — no data.



**Рис. 2.** Заболеваемость COVID-19 и генетическое разнообразие SARS-CoV-2 на территории ПК в 2020–2023 гг.

Левая ось ординат: ■ B.1.1 + B.1.1.x; ■ B.1.617.2.x; ■ BA.1.x; ■ BA.2.x; ■ BA.5.x; ■ XBB.x.  
Правая ось ординат: — в Приморском крае; — в России в целом.

**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.

**Таблица 3.** Распределение геновариантов вируса SARS-CoV-2 по периодам пандемии COVID-19 на территории ПК и России в целом в 2020–2023 гг.

**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).

Период Period	Территория Territory	Число образцов Number of samples	Геноварианты, %   Genovariants, %							не встречавшиеся в ПК 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	ПК   PK	23	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	РФ   RF	1701	65,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,7
II	ПК   PK	201	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	РФ   RF	7417	55,0	7,2	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	36,2
III	ПК   PK	30	3,3	0,0	96,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	РФ   RF	10 602	5,1	2,5	89,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8
IV	ПК   PK	46	2,2	0,0	97,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	РФ   RF	23 315	0,1	0,0	93,5	6,1	0,0	0,0	0,0	0,3
V	ПК   PK	368	0,0	0,0	33,4	48,9	17,7	0,0	0,0	0,0
	РФ   RF	24 416	0,1	0,0	11,4	38,9	42,5	6,2	0,0	0,9
VI	ПК   PK	201	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	98,0	0,0	0,0
	РФ   RF	28 300	0,0	0,0	0,0	2,1	11,4	85,7	0,7	0,1
VII	ПК   PK	130	0,0	0,0	0,9	0,0	2,7	1,1	96,2	0,0
	РФ   RF	4928	0,0	0,0	0,0	1,5	0,3	35,9	62,3	0,0

**Примечание.** РФ — Российская Федерация.

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

(B.1.1.7) — 7,2% и Delta (B.1.617.2) — 1,6 %. В ПК в этот период доминировала генетическая линия B.1.1 (68,4%); прочие геноварианты B.1.1.x (прежде всего B.1.1.317 и B.1.1.277.2) в совокупности составили 31,6%. В 2021 г. периоды подъёма заболеваемости были менее длительными, но характеризовались более интенсивным развитием эпидемического процесса. В это время в ПК были зарегистрированы III и IV подъёмы уровней заболеваемости с пиками на 27-й и 48-й неделях соответственно; в России III подъём продолжался в среднем 4 мес с максимальным уровнем заболеваемости на 29-й неделе, IV подъём — с сентября по январь 2021 г. В этот период активно шёл процесс изменения биологических свойств возбудителя: доля геноварианта Delta (B.1.617.2.x) увеличилась до 93–97%, практически вытеснив все ранее циркулировавшие линии.

Пятый подъём заболеваемости в целом по России и в ПК характеризовался резким скачком — пик заболеваемости был достигнут спустя 4 и 5 нед от начала подъёма. Показатели заболеваемости в этот период были значимо ( $p < 0,05$ ) выше, чем в предыдущие периоды. Этот подъём был обусловлен совместной циркуляцией уходящего варианта Delta (B.1.617.2.x) и приходящих ему на смену первых двух линий варианта Omicron (BA.1.x и BA.2.x). К концу V периода в мире установилось доминирование варианта Omicron. Сублинии Omicron BA.5.x, доля которых увеличилась до 90%, вызвали VI подъём заболеваемости в различных регионах России. При этом и в ПК, и в России в целом течение эпидемического процесса

отличалось от предыдущего периода меньшей интенсивностью и скоростью достижения пиковых показателей. Во время VII периода наблюдалось дальнейшее снижение интенсивности эпидемического процесса. Максимальное значение пика заболеваемости в среднем в России было зарегистрировано на 8-й неделе, в ПК — на 9-й неделе от начала подъёма. В этот период значительно увеличилось разнообразие субвариантов Omicron, один из них (XBV) быстро распространился по миру [33]. К концу января 2023 г. в России в целом и в ПК субварианты XBB.x преобладали, их доля в структуре субвариантов Omicron возросла до 62,3 и 92,8% соответственно.

При анализе клинических проявлений COVID-19 в ПК, как и в России в целом, преобладали заболевания в лёгкой (68,4 и 54,2% соответственно) и средней (29,3 и 42,7%) тяжести. Доля тяжёлых форм составляла 2,3 и 3,1% соответственно. Первая волна характеризовалась высокой долей пневмоний (20,9%) и бессимптомных форм (30,3%), доля тяжёлых форм составила 2,1% (табл. 2). По мере развития эпидемического процесса во II волне отмечался самый большой за весь период наблюдения удельный вес тяжёлых форм заболевания (5,8%), доля внебольничных пневмоний составляла 17,7%. На протяжении последующих периодов доля внебольничных пневмоний постепенно уменьшалась с 16,2% в III волне до 1,9% в VI волне. Удельный вес тяжёлых форм пневмоний также снизился с 3,1% до 0. Следует отметить, что удельный вес форм средней степени тяжести течения COVID-19

Доля вариантов SARS-CoV-2, %  
 Distribution of SARS-CoV-2 variants, %

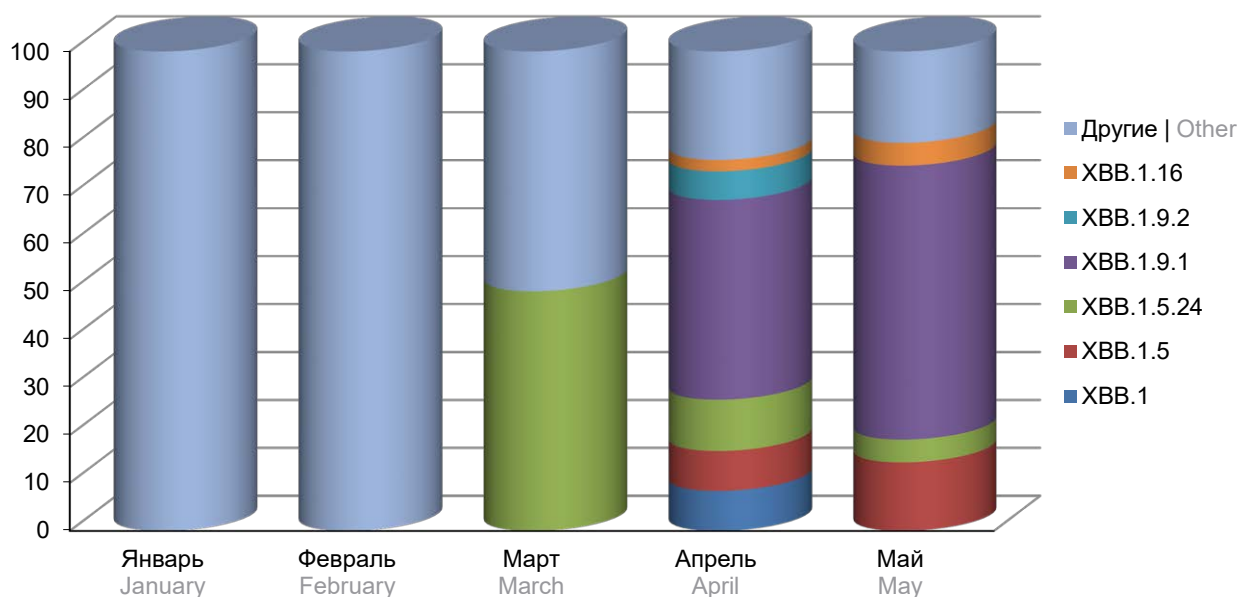
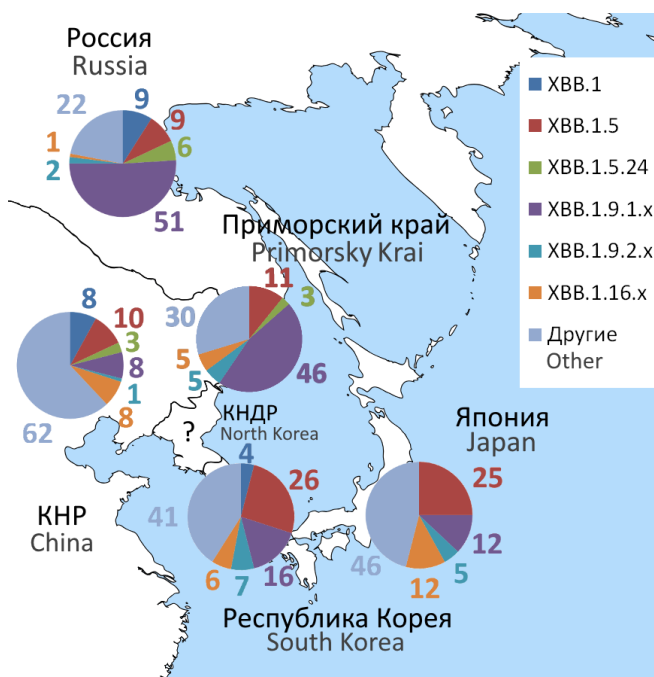


Рис. 3. Генетическое разнообразие SARS-CoV-2 в ПК с января по май 2023 г.  
 Fig. 3. Genetic diversity of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai from January to May 2023.



**Рис. 4.** Генетическое разнообразие SARS-CoV-2 в ПК, России в целом и сопредельных странах Восточной Азии накануне официального окончания пандемии 05.05.2023 (цифры при секторах круговых диаграмм соответствуют процентной доле данного геноварианта по данным GISAID).

**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).

распределялся по периодам подъёма неравномерно: увеличивался от I к III периоду (с 31,5 до 36,5%), к VI периоду снижался до 12,1% и в VII периоде вновь увеличивался до 25,1%.

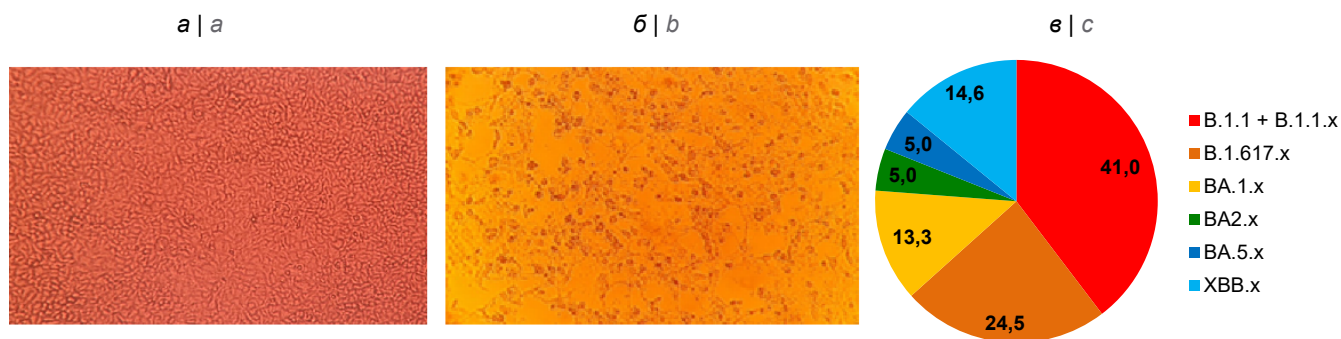
В VII эпидемическом периоде (май 2023 г.) в ПК преобладал вариант ХВВ.х, впервые зарегистрированный 31.01.2023 (линия ХВВ.1.14), к концу марта — линия ХВВ.1.5.24, подвид варианта ХВВ.1.5 (Kraken), к 05.05.2023 доминирующим стал вариант ХВВ.1.9.1 (Hyperion) (рис. 3). Особенно важно отметить высокую долю вариантов ХВВ.1.5.24 (9% в ПК и 6% по России в целом) и ХВВ.1.9.1 (45 и 51% соответственно), что резко контрастировало с генетическим пейзажем штаммов SARS-CoV-2 в сопредельных странах Юго-Восточной Азии (рис. 4). Такая картина, возможно, является следствием своевременного введения в России жёстких ограничительных мер, включающих прекращение транспортного сообщения со странами Азиатско-Тихоокеанского региона, в то время как относительная свобода сообщения России со странами Европы и ПК с центральной частью России сохранялась на всём протяжении пандемии.

**Изоляция штаммов SARS-CoV-2** была успешно проведена из 151 образца ОТ-ПЦР-РВ-положительных назофарингеальных смывов (эффективность изоляции составила 151/217 ≈ 69,6%). Полученные вирусные штаммы были депонированы в коллекцию патогенных микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова. Признаки цитопатического действия вируса в культуре клеток Vero-E6 наблюдались начиная

**Таблица 4.** Инфекционные титры штаммов SARS-CoV-2, изолированных в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (2020–2023 гг.)

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

Геновариант штамма Genovariant of the strain	Количество штаммов Number of strains	Распределение штаммов по значениям десятичного логарифма инфекционного титра, lg TCID <sub>50</sub> Distribution of strains according to the values of the decimal logarithm of the infectious titer, lg IT				M ± m	
		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
	ХВВ.х	22	13	8	1	0	3,5 ± 0,1

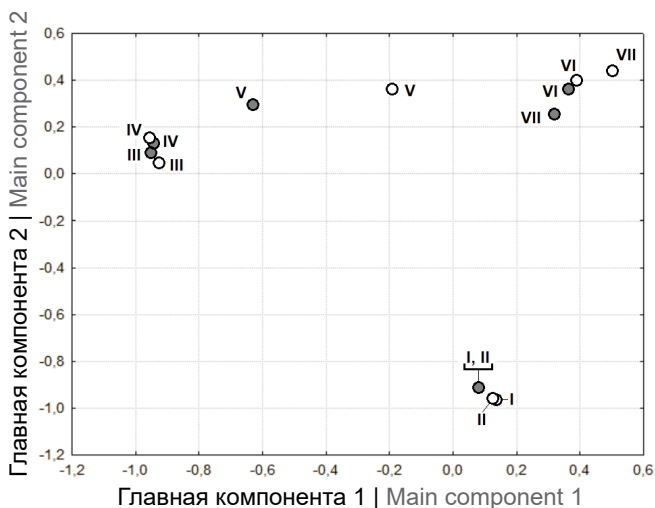


**Рис. 5.** Штаммы SARS-CoV-2, изолированные в чувствительной клеточной линии Vero-E6 в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова.

*a* — интактная клеточная линия; *b* — клеточная линия с проявлениями цитопатогенного действия штамма SARS-CoV-2/Russia\_Primorje/FE-R-6932 (Delta AY.122) на 5-е сутки после инфицирования (3 пассаж); *c* — распределение штаммов по геновариантам (цифры при секторах круговых диаграмм соответствуют процентной доле данного геноварианта).

**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 Rosпотrebnadzor

*a* — intact cell line; *b* — cell line with manifestations of cytopathogenic action of the SARS-CoV-2 strain/Russia\_Primorje/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).



**Рис. 6.** Плоскость двух первых главных компонент для различных эпидемических периодов COVID-19, обозначаемых латинскими цифрами (так же, как на рис. 2 и в табл. 2, 3): серые точки соответствуют ПК, белые — России.

**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.

со 2–4-х суток после инфицирования (рис. 5, *a, б*). Распределение полученных штаммов SARS-CoV-2 по генетическим линиям представлено на рис. 5, *в*, а по значениям  $Ig\ TCID_{50}$  — в табл. 4.

**Плоскость главных компонент для различных периодов пандемии COVID-19** в ПК и России, рассматриваемых как точки в восьмимерном пространстве признаков — компонент распределения SARS-CoV-2 по геновариантам (табл. 3) — представлена на рис. 6. Две первые главные компонен-

ты на рис. 6, соответствующие двум наибольшим собственным значениям ковариационной матрицы признаков, включают 63,6% информации о взаимном расположении объектов в многомерном признаковом пространстве. Известно, что вращение главных компонент на один и тот же угол не изменяет значения собственных чисел ковариационной матрицы [32]: на рис. 6 вращение компонент осуществлено таким образом, чтобы максимизировать дисперсию факторных нагрузок.

### Обсуждение

В России пандемия COVID-19 началась позже, чем во многих странах, вследствие применения строгих режимно-ограничительных и противоэпидемических мероприятий в отношении COVID-19, которые были регламентированы Указами Президента РФ<sup>7</sup>, Распоряжениями Правительства РФ<sup>8</sup> и Постановлениями Главного государственного санитарного врача РФ<sup>9</sup>. Мероприятия по предупреждению завоза и снижению рисков распространения COVID-19 на территории ПК вводились на основании как вышеперечисленных указов и распоряжений, так и Постановления губернатора ПК<sup>10</sup> и главного государственного санитарного врача по

<sup>7</sup> Указы Президента: от 25.09.2020 № 206; от 02.04.2020 № 239; от 02.04.2020 № 294.

<sup>8</sup> Распоряжения Правительства РФ: от 30.01.2020 № 140-р; от 31.01.2020 № 154-р; от 03.02.2020 № 194-р; от 18.02.2020 № 338-р; от 27.02.2020 № 447-р; от 27.02.2020 № 446-р; от 27.02.2020 № 448-р; от 16.03.2020 № 635-р; от 06.03.2020 № 550-р; от 12.03.2020 № 597-р; от 14.03.2020 № 622-р; от 16 марта 2020 № 730-р; от 27.03.2020 № 763-р.

<sup>9</sup> Постановления Главного государственного санитарного врача РФ: от 24.01.2020 № 2; от 31.01.2020 № 3; от 02.03.2020 № 5; от 13.03.2020 № 6; от 18.03.2020 № 7; от 30.03.2020 № 9.

<sup>10</sup> Постановление губернатора ПК от 18.03.2020 № 21-пп.

ПК<sup>11</sup>. Все проведённые на начальном этапе мероприятия позволили замедлить темпы распространения COVID-19, увеличить объём исследований на COVID-19 и мощность лабораторных баз, подготовить медицинские организации для оказания помощи больным, что предотвратило увеличение числа случаев тяжёлых форм заболевания и летальности.

Анализ проявлений эпидемического процесса COVID-19 в период с апреля 2020 г. по июнь 2023 г. на территории ПК и России в целом выявил 7 подъёмов заболеваемости, различавшихся по клинико-эпидемиологическим проявлениям течения COVID-19 в зависимости от геноварианта возбудителя (рис. 1, 2, табл. 2, 3). Сравнение заболеваемости COVID-19 в каждом периоде показало, что динамика развития эпидемического процесса в ПК аналогична общероссийской, что особенно наглядно демонстрирует рис. 6. При этом в структуре клинических форм заболевания в течение всей пандемии преобладали лёгкие и средней степени тяжести клинические формы.

Введение ограничительных мер в марте–апреле 2020 г. практически прекратило перемещение людей между ПК и сопредельными государствами (Китаем, Республикой Кореей, Японией), в результате чего динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 в регионе объяснялась исключительно внутрисредней миграцией, поэтому во время I и II периодов пандемии в ПК (как и в России в целом) доминирующим был геновариант Wuhan, в III и IV периодах — Delta, в V и в последующих подъёмах — различные геноварианты Omicron (рис. 2). Смена доминирующих геновариантов проиллюстрирована на рис. 3.

С середины 2022 г. началось постепенное смягчение режима перемещения с сопредельными странами, что не могло не сказаться на разнообразии геновариантов Omicron, циркулирующих в ПК. Так, в ПК к концу апреля – началу мая 2023 г. доля вариантов ХВВ.1.9.2 и ХВВ.1.16 (Arcturus) была несколько выше, чем в России в целом. В то же время доля варианта ХВВ.1.9.2 была наиболее велика в Республике Корея, а варианта ХВВ.1.16 — в Японии (рис. 4). Эти данные позволяют предполагать определённое участие сопредельных стран Азиатско-Тихоокеанского региона в формировании генетического ландшафта SARS-CoV-2 в ПК на заключительном этапе пандемии. Данные филогенетического анализа образцов редкого в России субварианта BN (рис. 5) также могут служить косвенным подтверждением множественности путей проникновения вируса в регион. При этом в ПК доля зарегистрированных случаев COVID-19, этиологическим фактором которых являлись ХВВ.1.9.2

(5%) и ХВВ.1.16 (3%), была сопоставима с таковыми в Республике Корея (ХВВ.1.9.2 — 7%), и в Японии (ХВВ.1.16 — 12%; рис. 4), в отличие от среднероссийских значений (ХВВ.1.9.2 — 2%, ХВВ.1.16 — 1%) [34–36]. Эти данные позволяют предполагать возможное участие геновариантов возбудителя, циркулирующих в сопредельных странах Азиатско-Тихоокеанского региона, в формировании генетического ландшафта SARS-CoV-2 в ПК на заключительном этапе пандемии.

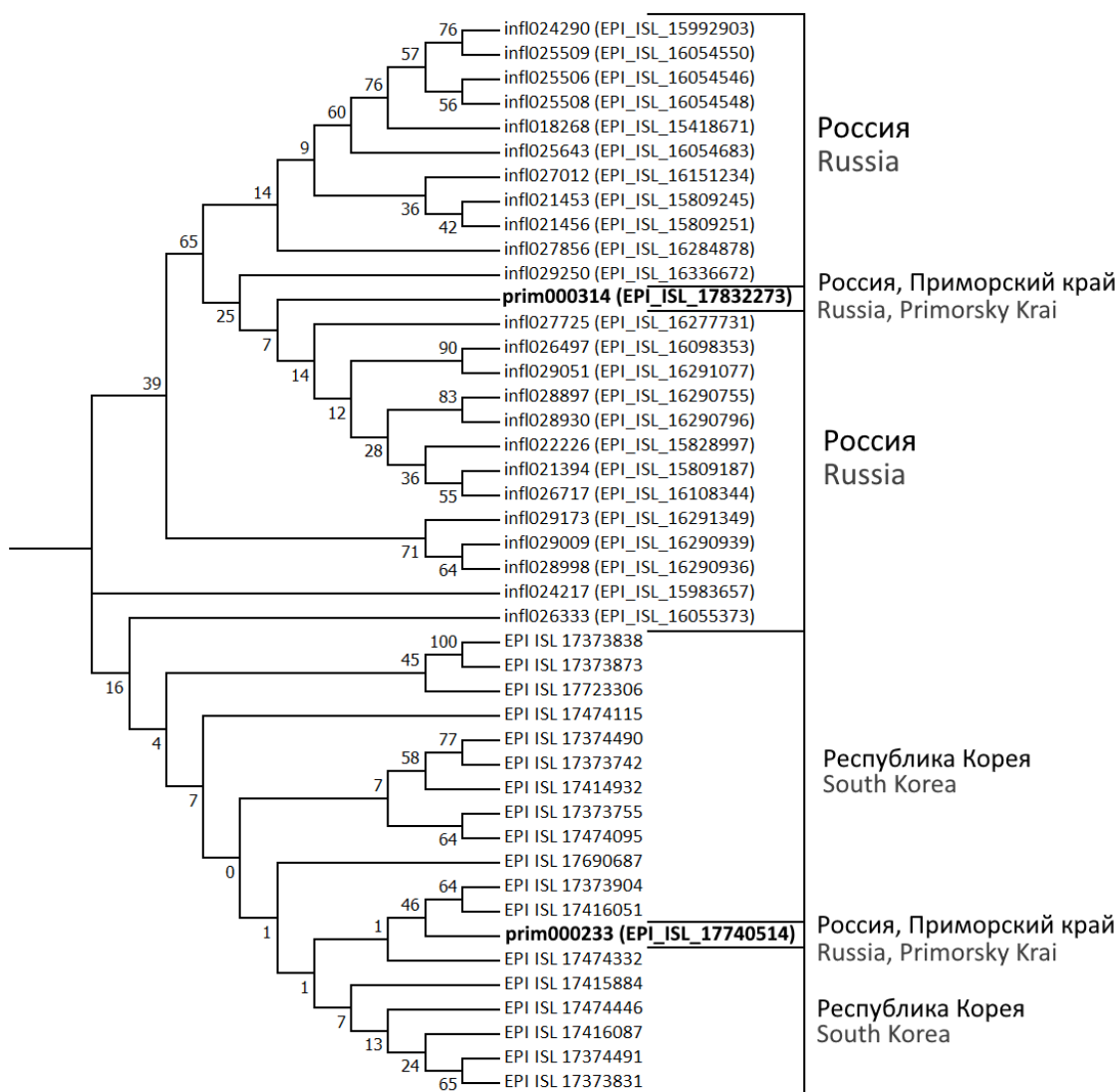
Филогенетический анализ изолятов, относящихся к линии BN, слабо представленной в России (около 150 образцов в GISAID), но характерной для Республики Корея [37], подтверждает возможность завоза новых вариантов вируса в ПК из этой страны. По данным сайта Pango, 37% изолятов линии BN.1.2, 41% линии BN.1.2.3 и 25% линии BN.1.3 происходят из РК. Филогенетический анализ наиболее близких по структуре образцов SARS-CoV-2 из России и Республики Корея показал, что образец p1m000233 (BN.1.2, дата забора 14.04.2023) относится, скорее, к группе южнокорейских изолятов, в то время как образец p1m000314 (BN.1.2.3, дата забора 10.04.2023) — к группе изолятов, выделенных из центральной части России (рис. 7; низкие значения bootstrap-поддержки для некоторых кластеров на этом рисунке объясняются высокой степенью гомологии анализируемых последовательностей, что характерно для большинства региональных исследований SARS-CoV-2 [38–42]). Данные результаты могут также служить косвенным подтверждением множественности путей проникновения вируса в регион.

В процессе изоляции штаммов SARS-CoV-2 отмечено значимое снижение титров геновариантов Delta и Omicron, что свидетельствует об уменьшении их вирулентности (скорости репликации и накопления вируса) по сравнению с Wuhan-подобными вариантами (табл. 4). Полученные результаты согласуются с эпидемиологическими проявлениями инфекционного процесса — повышением контактности вариантов SARS-CoV-2 и снижением тяжести клинических проявлений инфекции.

Распределение генотипов SARS-CoV-2, выявленных в клиническом материале (рис. 1, б, в), свидетельствует о преобладании варианта Omicron (59,7%), в то время как среди изолированных штаммов доминируют Wuhan-подобные варианты (41,0%), что объясняется их более высокой вирулентностью. Это подтверждает правильность выбора стратегии оперативного эпидемиологического мониторинга, основанного на секвенировании полноразмерного вирусного генома именно из первичного клинического материала (хотя это не исключает необходимость изоляции различных вариантов возбудителя для проведения вирусологических исследований).

Таким образом, уникальность формирования генотипического портрета SARS-CoV-2 на терри-

<sup>11</sup> Постановление Главного государственного санитарного врача ПК от 20.04.2020 № 17.



**Рис. 7.** Филогенетическое древо наиболее гомологичных друг другу вирусов SARS-CoV-2 линии BN.

Для образцов из России указаны номера в VGARus и номера в GISAID (в скобках). Для образцов из Республики Корея указаны номера в GISAID. Номера образцов из ПК выделены жирным шрифтом.

**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.

тории ПК в период пандемии COVID-19 заключается в возможности завоза вируса как из европейской части России, так и из стран Восточной Азии. Последнее направление представляется наиболее актуальным в связи со стратегическим «восточным вектором» внешней политики, который последовательно реализует Правительство РФ. Сохраняющаяся возможность возникновения в сопредельных государствах новых, особо опасных вариантов вируса делает молекулярно-генетический мониторинг SARS-CoV-2 на территории ПК особенно актуальным. Ретроспективный анализ эпидемического процесса COVID19 на конкретной территории является необходимым условием для формирования моделей и прогнозов развития ситуации, позволяет иденти-

фицировать факторы риска, связанные с распространением и тяжестью заболевания, оценить эффективность принятых мер, повысить надёжность обеспечения биологической безопасности.

#### 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-HOI-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/hgqiyl>
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/gegdll>
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. Экология 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/wfkuc>
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/ulfnnf>
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 sw1 на Дальнем Востоке в 2009 г. *Вопросы вирусологии*

- логии. 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/zxgtfd>
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., Федорев 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/lfulj>
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/yrqiqn>
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., Plianchaisuk 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=f1845468\\_3](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/05062023xbb.1.16.pdf?sfvrsn=f1845468_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>
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>

**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](mailto: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>

**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 Rosпотребнадзор, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, [adorob@mail.ru](mailto: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 Rosпотребнадзор, 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 Rosпотребнадзор, 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 Rosпотребнадзор, 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>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*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 Наталья 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; *Просянкина 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

*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 Rosпотребнадзор 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

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



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

Файзулов Е.Б.<sup>1,2✉</sup>, Грачева А.В.<sup>1</sup>, Корчевая Е.Р.<sup>1</sup>, Аммура Ю.И.<sup>1</sup>, Смирнова Д.И.<sup>1</sup>, Хохлова Д.М.<sup>1</sup>, Дроков А.О.<sup>3</sup>, Панкратов А.А.<sup>4</sup>, Трунова Г.В.<sup>4</sup>, Хохлова В.А.<sup>4</sup>, Воронцова М.С.<sup>4</sup>, Ленева И.А.<sup>1</sup>, Свитич О.А.<sup>1,3</sup>, Зверев В.В.<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия;

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

<sup>4</sup>Московский 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 холодоадаптированным 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, холодоадаптированный 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 Федерации 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., Аммура 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 иммунологии*. 2024;101(1):36–51.

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

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

# 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<sup>1,2✉</sup>, Anastasiia V. Gracheva<sup>1</sup>, Ekaterina R. Korchevaya<sup>1</sup>, Yulia I. Ammour<sup>1</sup>, Daria I. Smirnova<sup>1</sup>, Darya M. Khokhlova<sup>1</sup>, Andrey O. Drovkov<sup>3</sup>, Andrey A. Pankratov<sup>4</sup>, Galina V. Trunova<sup>4</sup>, Varvara A. Khokhlova<sup>4</sup>, Maria S. Vorontsova<sup>4</sup>, Irina A. Leneva<sup>1</sup>, Oxana A. Svitich<sup>1,3</sup>, Vitaly V. Zverev<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

<sup>4</sup>P.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>

## Введение

Несмотря на объявленное ВОЗ завершение пандемии COVID-19, проблема вакцинопрофилактики этого заболевания остаётся актуальной. Для специфической профилактики COVID-19 применяются инактивированные, векторные, субъединичные, мРНК-вакцины, которые показали высокую эффективность против гомологичного заражения (т.е. заражения вариантом вируса, на основе которого разработана вакцина) [1]. Появление и широкое распространение варианта Omicron и его сублиний резко снизило эффективность вакцинопрофилактики [1–3]. Это связано с тем, что активность большинства лицензированных вакцин против COVID-19 направлена на формирование гуморального иммунитета, обусловленного индукцией нейтрализующих антител к S-белку SARS-CoV-2. Однако эволюция вируса и возникающее при массовой иммунизации давление делают данную мишень очень изменчивой, что приводит к ускользанию вируса от иммунологического надзора и быстрому снижению эффективности вакцин против возникающих новых вариантов SARS-CoV-2 [2–4].

Для поддержания эффективности вакцинации на высоком уровне необходимо своевременно оптимизировать состав существующих вакцин в соответствии с актуальным набором циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 [5]. Альтернативным подходом к решению проблемы было бы создание «универсальной» вакцины, обладающей перекрёстной протективной активностью в отношении разных антигенных вариантов вируса. Такой подход включает разработку живой аттенуированной вакцины (ЖАВ), способной активировать не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета, обеспечивая стойкий иммунный ответ и перекрёстную защиту от разных геновариантов вируса [6–8]. В настоящее время потенциал ЖАВ в профилактике COVID-19 остаётся нереализованным.

Вместе с тем к настоящему моменту уже накоплен определённый опыт получения аттенуированных штаммов SARS-CoV-2, показавших высокую иммуногенность и эффективность иммунизации на животных моделях инфекции. Одни авторы для аттенуации вируса используют методы генной инженерии и обратной генетики, такие как сайт-направленный мутагенез и деоптимизация кодонов [9–13]. Другие используют традиционный подход, направленный на получение мутантов вируса путём длительного пассирования в культуре клеток в селективных условиях [14–17]. Независимо от методологии, применяемой для аттенуации вируса, важным вопросом, который определяет практическую значимость ЖАВ на настоящем этапе, является: сможет ли она обеспечить эффективную защиту не только при заражении «родительским» штаммом

SARS-CoV-2, но и новыми, филогенетически отдалёнными вариантами вируса?

Ранее путём длительного пассирования Ухань-подобного штамма SARS-CoV-2 Dubrovka (D) в клетках Vero при пониженной температуре мы получили его холодоадаптированный (*ca*) вариант, названный штаммом D-D2 [18]. Штамм D-D2 проявлял температурочувствительный (*ts*) фенотип (не размножался при 39°C), что определяло его сниженную репродуктивную способность в лёгких и аттенуационный (*att*) фенотип для золотистых сирийских хомячков. При интраназальной иммунизации хомячков штамм D-D2 проявлял высокую иммуногенность и защищал от заражения гомологичным родителем штаммом D и развития пневмонии [15].

**Целью** настоящего исследования было определение защитной эффективности иммунизации аттенуированным Ухань-подобным штаммом SARS-CoV-2 при гетерологичном заражении штаммами, которые относятся к варианту Delta, и двум сублиниям варианта Omicron — BA.1.1 и BA.5.2. Для иммунизации в качестве модельного вакцинного штамма использовали *ca/ts/att* штамм D-D2.

## Материалы и методы

### Вирусы

Для моделирования коронавирусной пневмонии на золотистых сирийских хомячках (далее — хомячки) использованы лабораторные штаммы SARS-CoV-2 (семейство: *Coronaviridae*, род: *Betacoronavirus*, подрод: *Sarbecovirus*, вид: *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*: Dubrovka (Wuhan-подобный), Podolsk (Delta); Otradnoe (Omicron BA.1.1), FEB2 (Omicron BA.5.2), изолированные и генетически охарактеризованные в НИИВС им. И.И. Мечникова в разные периоды пандемии (табл. 1). Для иммунизации животных использован холодоадаптированный штамм D-D2, обладающий *ts* и *att* фенотипом, полученный нами ранее путём адаптации штамма Dubrovka к росту в культуре клеток Vero CCL-81 при пониженной температуре (23°C) [18].

### Культивирование клеток и вируса

Лабораторные штаммы SARS-CoV-2 культивировали на клетках эпителия почек африканской зелёной обезьяны Vero CCL-81 (ATCC), как описано ранее [19]. Монослой клеток Vero инфицировали SARS-CoV-2 при низкой множественности заражения ( $MOI \leq 0,001$ ) и инкубировали при температуре 37°C (штаммы Dubrovka, Podolsk, Otradnoe и FEB2) или 23°C (штамм D-D2) в течение 3–8 дней (в зависимости от штамма вируса) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Вирусосодержащую культуральную среду осветляли центрифугированием и хранили при температуре –80°C до использования.

**Таблица 1.** Штаммы SARS-CoV-2, использованные в исследовании  
**Table 1.** SARS-CoV-2 strains used in the study

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

### Животные

Четырехнедельные самки золотистых сирийских хомячков массой 40–50 г (*Mesocricetus auratus*) были получены из питомника лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пущино (Московская обл.). Хомячки были случайным образом распределены по группам. Содержание животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Кормили животных брикетированными кормами в соответствии с утвержденными нормами.

При проведении экспериментального исследования на животных авторы соблюдали институциональные и национальные стандарты по использованию лабораторных животных. Проведение исследования одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 2 от 24.05.2021).

### Титрование вируса

Титр SARS-CoV-2 определяли по конечной точке проявления цитопатического действия в культуре клеток Vero, как описано ранее [19]. Титр вируса рассчитывали методом Reed–Muench, используя онлайн-калькулятор<sup>1</sup>, и выражали в lg ТЦД<sub>50</sub> (тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя) на 1 мл.

### Количественное определение РНК SARS-CoV-2

Количественное определение РНК SARS-CoV-2 проводили методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) [20]. Вирусную РНК выделяли из образцов с использованием набора реагентов «MagnoPrime UNI» («NextBio»), рекомендованного производителем для выделения

вирусной РНК из широкого спектра биологических и клинических образцов. Для обнаружения вирусной РНК использовали праймеры и зонд, направленные к гену *N* нуклеокапсида SARS-CoV-2: CoVN-F GCGTTCCTTCGGAATGTTCG; COVN-R TTGGATCTTTGTATCCAATTTG; COVN-P FAM-AACGTGGTTGACCTACACAGGT-BHQ1 [21]. Для проведения одноэтапной реакции ОТ-ПЦР-РВ использовали 2,5-кратную реакционную смесь для ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой и обратную транскриптазу MMLV («Синтол»). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 30 ед. обратной транскриптазы MMLV, по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда. Температурно-временной режим: 45°C — 10 мин (1 цикл); 95°C — 5 мин (1 цикл); 95°C — 5 с, 55°C — 45 с (45 циклов). Для построения калибровочного графика использовали синтетический олигонуклеотид, соответствующий амплифицируемому фрагменту генома SARS-CoV-2: COVN-PC CAGCGTTCCTTCGGAATGTTCGCGCATTTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAA. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ, установленная путём анализа 10-кратных разведений олигонуклеотида COVN-PC (модель кДНК SARS-CoV-2), составила  $5 \times 10^2$  копий/мл. С поправкой на потери на этапах выделения РНК и обратной транскрипции чувствительность определения РНК SARS-CoV-2 оценена в  $10^3$  копий РНК/мл. График зависимости значений пороговых циклов от концентрации вирусной РНК описывался уравнением:

$$Y = 48,816 \times 3,5348X,$$

где  $Y$  — это значение порогового цикла;  $X$  — концентрация вирусной РНК (lg копий/мл).

Результаты количественной ОТ-ПЦР-РВ выражали в копиях вирусной РНК на 1 мл гомогената ткани.

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



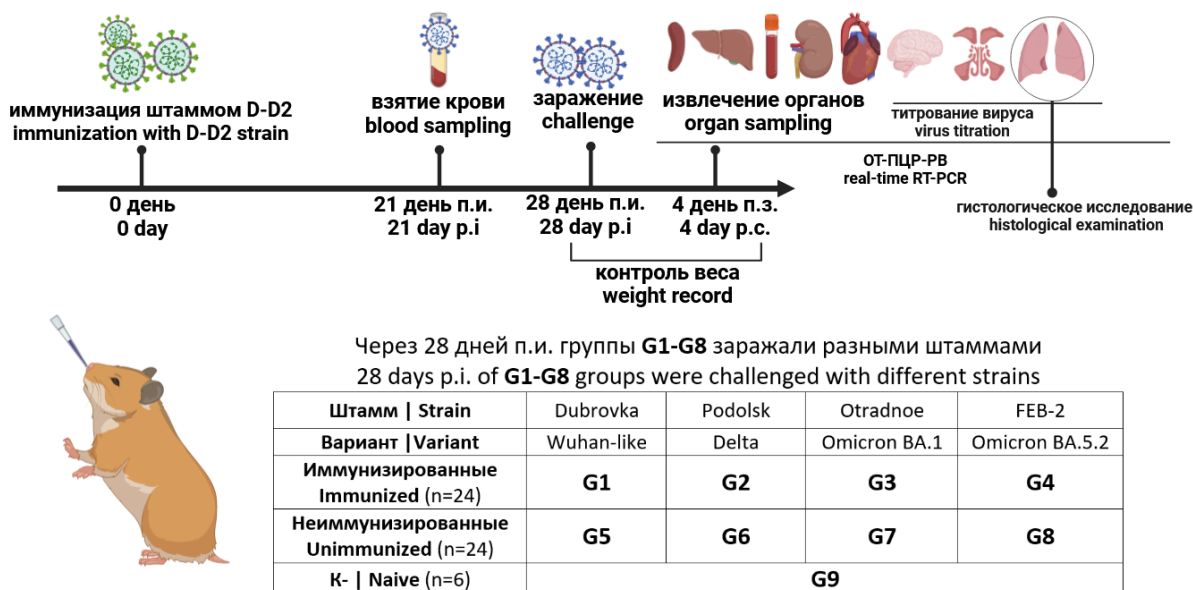


Рис. 1. Схема эксперимента по оценке эффективности иммунизации.

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

### Оценка эффективности иммунизации

Эффективность иммунизации оценивали в соответствии со схемой (рис. 1). Сирийских хомячков разделили на 9 групп (G1–G9) по 6 животных в каждой. Каждому животному групп G1–G4 интраназально под лёгким эфирным наркозом вводили по 100 мкл штамма D-D2 в дозе 4,0 lg ТЦД<sub>50</sub>. Неиммунизированным животным групп G5–G9 интраназально вводили фосфатно-солевой буфер рН 7,2. Через 21 день после иммунизации (п.и.) у животных брали кровь для оценки суммарных и нейтрализующих антител к SARS-CoV-2. Для оценки эффективности иммунизации через 28 дней п.и. каждого животного из групп G1–G8 интраназально заражали вирулентным штаммом SARS-CoV-2 в дозе 4,0 lg ТЦД<sub>50</sub>. Группы G1 и G5 заражали родительским штаммом Dubrovka; группы G2 и G6 — штаммом Podolsk (Delta); группы G3 и G7 — штаммом Otradnoe (Omicron BA.1.1); группы G4 и G8 — штаммом FEB2 (Omicron BA.5.2). Группе отрицательного контроля (К–) G9 вводили эквивалентный объём фосфатно-солевого буфера.

За хомячками проводили ежедневное наблюдение, контроль массы проводили с 0-го по 4-й день после заражения (п.з.). Через 4 дня п.з. животных гуманно умерщвляли под хлороформным наркозом. Левое лёгкое было взято для гистологического исследования. Лёгкие, головной мозг и другие органы извлекали, гомогенизировали в среде DMEM с гентамицином (40 мкг/мл) с использованием гомогенизатора «Tissue Lyser LT» («Qiagen») и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Надосадочную жидкость собирали и хранили при температуре –80°C для последующего титрования и определения вирусной РНК. Эффективность им-

мунизации оценивали путём сравнения динамики массы, вирусной нагрузки в органах и гистопатологических изменений лёгких у иммунизированных и неиммунизированных животных.

### Гистологическое исследование лёгких

Для морфологического исследования у хомячков проводили забор левых лёгких, которые фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 ч. После фиксации органы заключали в гистомикс, изготавливали серийные срезы толщиной 3–5 мкм. На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезах лёгких хомячков оценивали выраженность патоморфологических изменений и выражали её в баллах. Для этого каждому зашифрованному гистологическому препарату присваивали совокупный балл тяжести альтеративно-воспалительного процесса, рассчитанный путём сложения баллов (от 0 до 3) по критериям морфологической оценки, предложенным A.D. Gruber и соавт. [22]:

- доля (%) поражённой площади лёгких;
- характер распределения очагов пневмонии;
- повреждение эпителиальной выстилки бронхов и бронхиол;
- клеточный дебрис в просвете бронхов и бронхиол;
- бронхит;
- бронхоинтерстициальная пневмония;
- интерстициальная пневмония;
- диффузное повреждение альвеол (некроз альвеолоцитов, клеточный дебрис в просветах альвеол, интраальвеолярное кровоизлияние, интраальвеолярный отёк, интерстициальный отёк, воспалительный инфильтрат в межальвеолярных перегородках);

- внутриальвеолярные нейтрофилы и макрофаги;
- васкулит;
- некроз и десквамация клеток эндотелия сосудов;
- гиперплазия клеток мерцательного эпителия бронхов;
- гиперплазия альвеолоцитов II типа.

Максимально возможное количество баллов — 60. Проводили фотофиксацию полученных гистологических срезов.

#### Определение антител к SARS-CoV-2

Антитела к SARS-CoV-2 в сыворотках крови хомячков определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), как описано ранее [15]. Для постановки ИФА в 96-луночные планшеты сорбировали препарат SARS-CoV-2 штамма Dubrovka, инактивированного УФ-излучением, приготовленный, как описано ранее [20].

#### Реакция нейтрализации

Оценку нейтрализующих SARS-CoV-2 антител проводили в клетках Vero, как описано ранее [19]. Для определения нейтрализующей активности антител в отношении различных антигенных вариантов SARS-CoV-2 были использованы штаммы Dubrovka, Podolsk, Otradnoe и FEB2, адаптированные к росту в

клетках Vero. Нейтрализующим титром считали величину, обратную последнему разведению, при котором в двух или более лунках не было обнаружено признаков цитопатического действия.

#### Статистический анализ

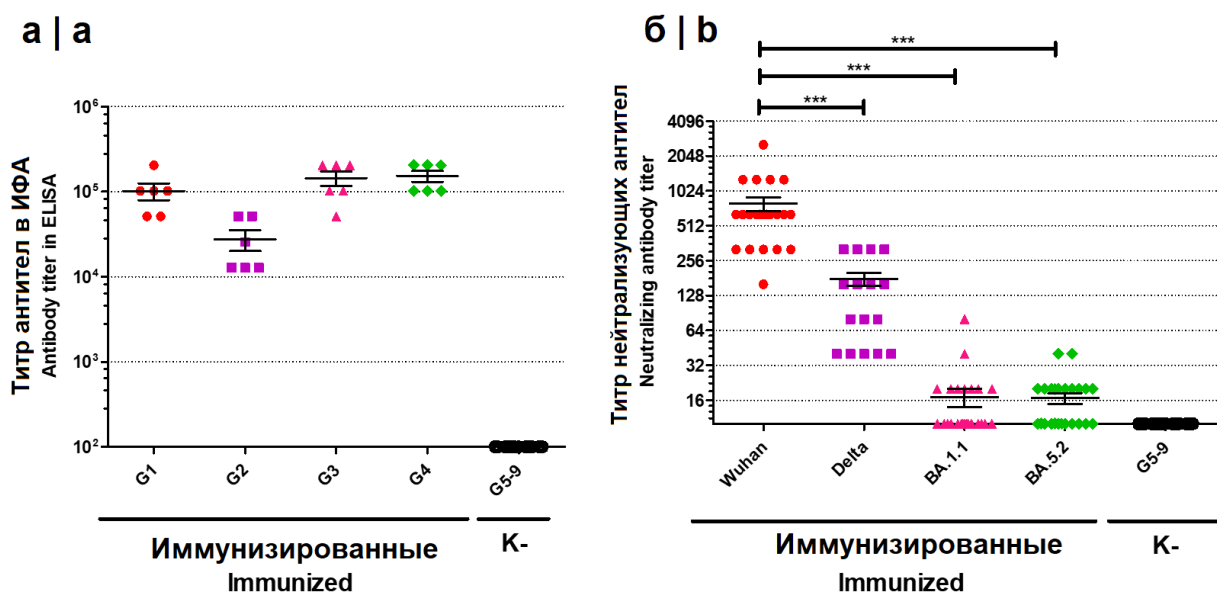
Статистическая обработка проводилась с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism v. 5.03». Данные на графиках представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение (SD) или  $\pm$  стандартная ошибка (SE). Достоверность разницы оценивали с использованием t-критерия для парных выборок. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Требования к безопасности работ

Все работы с вирусом SARS-CoV-2 проводили в условиях, отвечающих требованиям безопасности работ с ПБА II группы патогенности.

#### Результаты

Оценку иммуногенности и эффективности аттенуированного штамма D-D2 (ca/ts мутанта штамма Dubrovka) проводили в эксперименте по иммунизации золотистых сирийских хомячков согласно схеме (рис. 1). Хомячков групп G1–G4 ( $n = 24$ ) интраназально иммунизировали штаммом D-D2 в дозе по 4,0 lg ТЦД<sub>50</sub> на голову.



**Рис. 2.** Иммуногенность штамма D-D2 для хомячков при однократной интраназальной иммунизации.

*a* — титр IgG к SARS-CoV-2 в ИФА; *b* — титр нейтрализующих антител к различным штаммам SARS-CoV-2 в крови животных групп G1–G4 ( $n = 24$ ) — Dubrovka (Wuhan), Podolsk (Delta), Otradnoe (BA.1.1), and FEB2 (BA.5.2). Предел чувствительности — 20. \*\*\* $p < 0,001$ .

**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. \*\*\* $p < 0.001$ .

### Оценка иммуногенности

Через 21 день п.и. в сыворотках всех иммунизированных животных методом ИФА обнаруживались IgG к структурным белкам SARS-CoV-2 в титре от 12 800 до 204 800 (в среднем  $54\,933 \pm 44\,257$ ) (рис. 2, а). Вируснейтрализующая активность сывороток хомячков после иммунизации штаммом D-D2 была максимальной для гомологичного штамма Dubrovka —  $793 \pm 524$  (рис. 2, б). Для гетерологичных штаммов нейтрализующая активность сывороток была ниже: для штамма Podolsk (Delta) — в 4 раза, для штаммов Otradnoe и FEB2 (Omicron) — в 46 раз. В 56% образцов сывороток нейтрализующая активность в отношении штаммов Otradnoe и FEB2 не обнаружена. В сыворотках неиммунизированных животных (группы G5–G9;  $n = 30$ ) антитела к вирусу не были обнаружены ни методом ИФА, ни в реакции нейтрализации.

### Оценка эффективности иммунизации

Через 28 дней п.и. животных заражали разными штаммами SARS-CoV-2 (рис. 1). Заражение неиммунизированных сирийских хомячков (группы G5–G8) разными штаммами выявило различия в их вирулентности. Штамм Dubrovka проявил наибольшую вирулентность и приводил к потере массы в среднем на 14,6% ( $p = 0,0002$ ) на 4-й день п.з. (рис. 3), наиболее тяжёлой пневмонии (рис. 4, 5), инфицированию не только дыхательных путей, но

и головного мозга (рис. 6, 7), что сопровождалось снижением аппетита, вялостью и сонливостью. При заражении неиммунизированных животных штаммами Podolsk, Otradnoe и FEB2 потеря массы была незначительной ( $p > 0,05$ ) — в среднем 2,15, 1,2 и 2,4% по сравнению с группой G9 (K–), при этом гистопатология лёгких и вирусная нагрузка в головном мозге были ниже, чем при заражении штаммом Dubrovka (рис. 4–7).

У всех иммунизированных хомячков не наблюдалось задержки в наборе массы и изменений в поведении по сравнению с неиммунизированными животными (рис. 3). Среди иммунизированных животных (группы G1–G4) наиболее выраженная защита от потери массы наблюдалась в группе G1, заражённой штаммом Dubrovka, — 12,7% ( $p < 0,0001$ ) на 4-й день п.и. При заражении штаммами Podolsk (группа G2) и FEB2 (группа G4) разница в массе иммунизированных и неиммунизированных животных была незначительной ( $p > 0,05$ ), достигнув 2,61 и 2,48% на 4-й день п.з. соответственно. При заражении штаммом Otradnoe (группа G3) разница в массе иммунизированных и неиммунизированных животных была слабо выраженной, но достоверной ( $p = 0,02$ ) — 2,45% на 3-й и 4-й дни п.з.

Морфологическая картина воспалительных изменений в лёгких у заражённых неиммунизированных хомячков (группы G5–G9) соответствовала интерстициальной пневмонии, но выраженность и

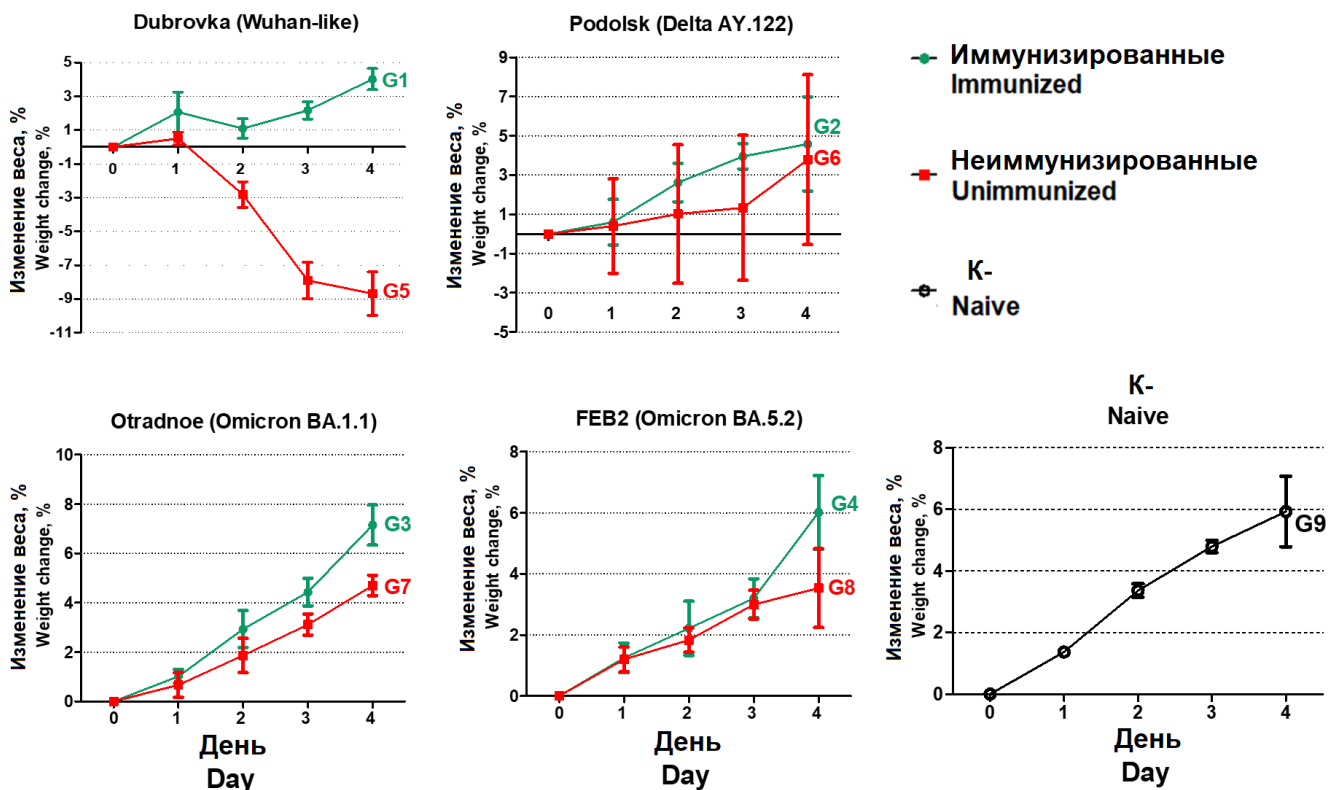
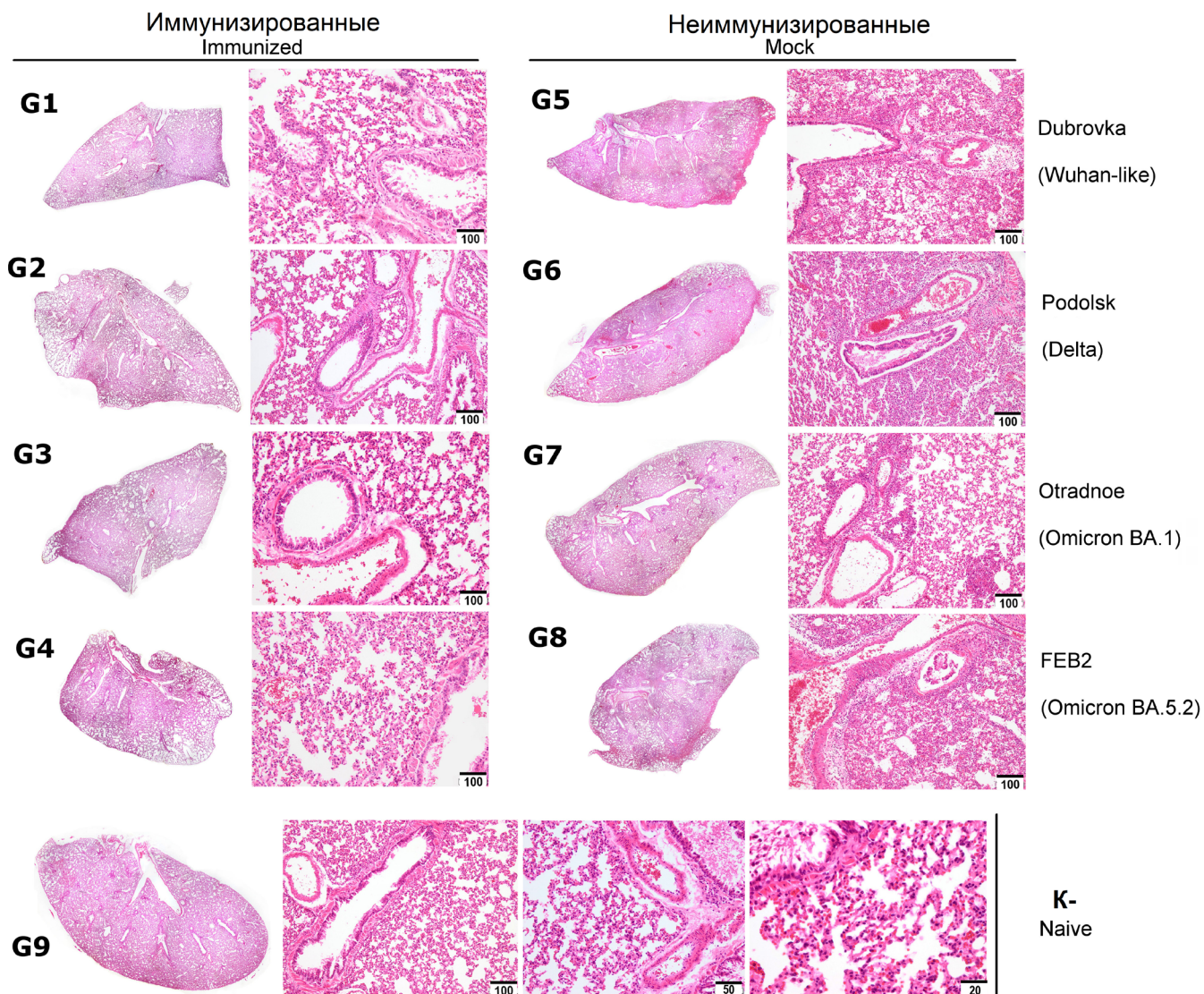


Рис. 3. Изменение массы иммунизированных и неиммунизированных хомячков на 1–4-й день п.з.

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



**Рис. 4.** Морфологические изменения в лёгких хомячков на 4-й день после заражения разными штаммами SARS-CoV-2.

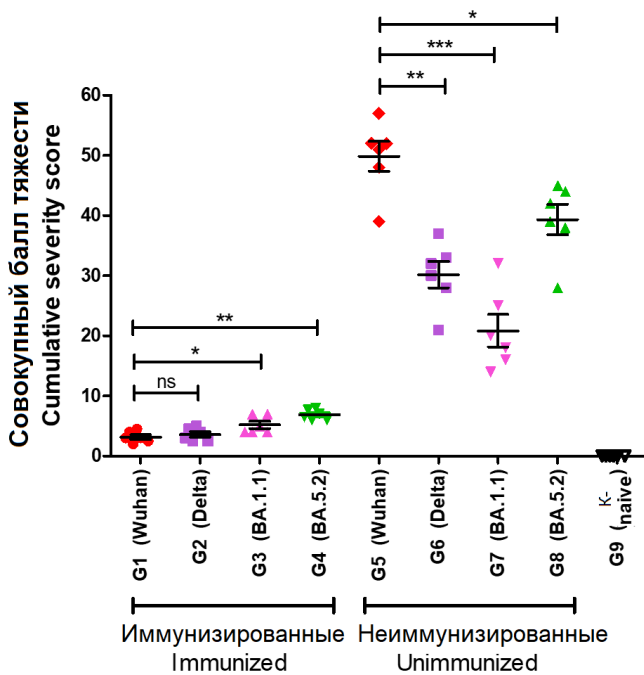
Окрашивание гематоксилином и эозином. Размер масштабной линейки выражен в мкм.

**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.

распространённость поражений зависела от штамма (рис. 4). На 4-е сутки после заражения Ухань-подобным штаммом Dubrovka (группа G5) в гистологических препаратах лёгких животных наблюдали выраженные альтеративно-воспалительные изменения, которые по морфологической картине соответствовали интерстициальной пневмонии в вирусной стадии. Участки пневмонии занимали 50–90% площади гистологического среза органа, что позволило охарактеризовать степень распространённости воспалительного процесса в лёгких хомячков как субтотальную. В гистопрепаратах хомячков группы G6, заражённых штаммом Podolsk (Delta), очаги интерстициальной пневмонии занимали 15–50% площади среза органа. Морфологическая характе-

ристика лёгких хомячков групп G7 и G8, заражённых штаммами Otradnoe (Omicron BA 1.15) и FEB-2 (Omicron BA 5.2), сильно отличалась, несмотря на филогенетическую близость этих штаммов. После заражения штаммом Otradnoe в гистопрепаратах выявлены очаги интерстициальной пневмонии, которые занимали не более 5–7% площади среза органа. Напротив, при заражении штаммом FEB-2 очаги пневмонии занимали 40–60% площади среза органа, а морфологическая картина воспалительных изменений была схожей с таковой у хомячков, заражённых штаммом Dubrovka (рис. 4).

Гистологическое исследование лёгких иммунизированных хомячков (группы G1–G4) через 4 дня п.з. не выявило патоморфологических изме-



**Рис. 5.** Оценка гистопатологии лёгких хомячков на 4-й день после заражения разными штаммами SARS-CoV-2.  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

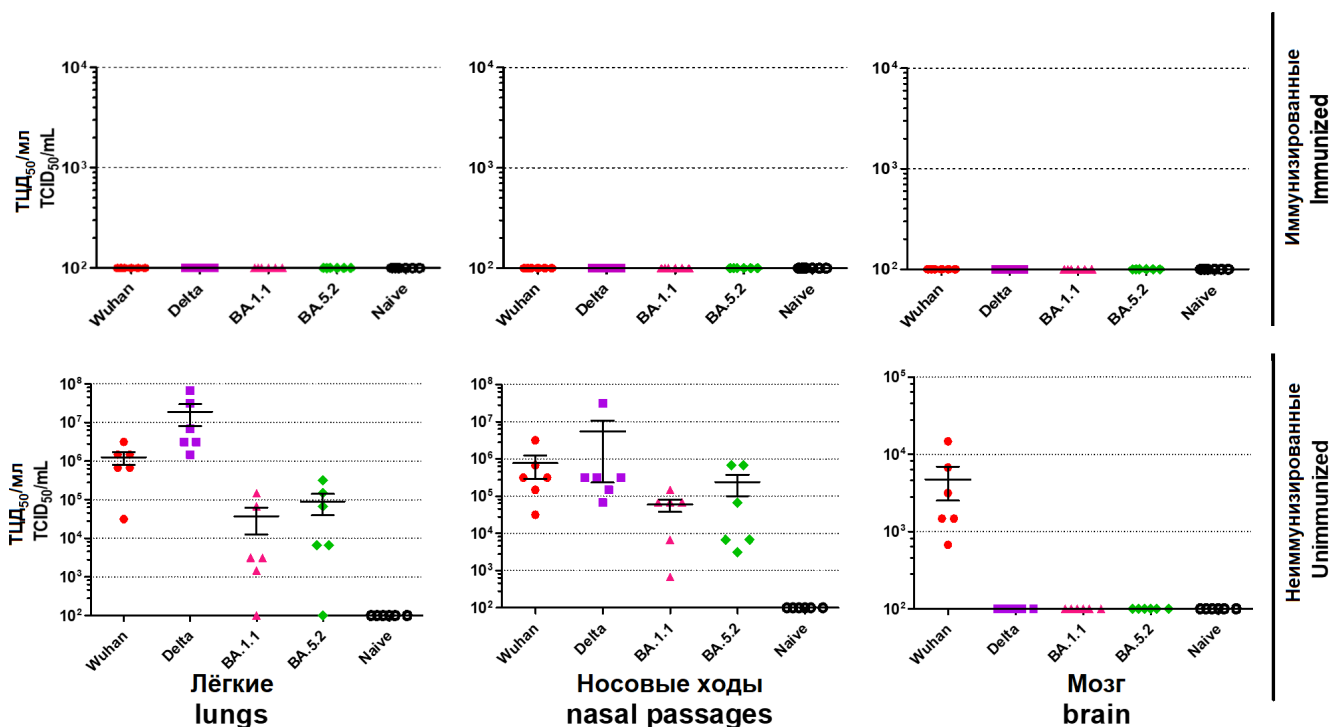
**Fig. 5.** Histopathology score for hamster lungs on day 4 post-challenge with different SARS-CoV-2 strains.  
\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

нений, либо воспалительные изменения были слабо выраженными (рис. 4). В гистопрепаратах лёгких хомячков, иммунизированных и заражённых штаммами Dubrovka (группа G1) и Podolsk (группа G2), патоморфологические изменения не установлены. Гистологическое строение воздухоносных путей и респираторного отдела лёгкого соответствовало варианту нормы. В гистопрепаратах лёгкого иммунизированных хомячков, заражённых штаммами Otradnoe (группа G3) и FEB-2 (группа G4), выявлены очаговые слабо выраженные воспалительные изменения в бронхах, при этом гистоструктура остальных элементов лёгкого хомячков не отличалась от таковой у животных отрицательного контроля (группа G9).

При гистологическом исследовании в препаратах лёгких неиммунизированных незаражённых хомячков (группа G9) патологических изменений не выявлено (рис. 4).

Таким образом, гистологическое исследование лёгких показало, что иммунизация штаммом D-D2 защищает животных от развития вирусной пневмонии независимо от штамма SARS-CoV-2, использованного для заражения.

На основании гистологического исследования степень патологических изменений в лёгких животных групп G1–G9 была выражена в баллах по A.D. Gruber и соавт. [22] (рис. 5). У иммунизирован-



**Рис. 6.** Титр вируса в лёгких, носовых ходах и головном мозге иммунизированных и неиммунизированных хомячков. Предел чувствительности —  $2,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ .

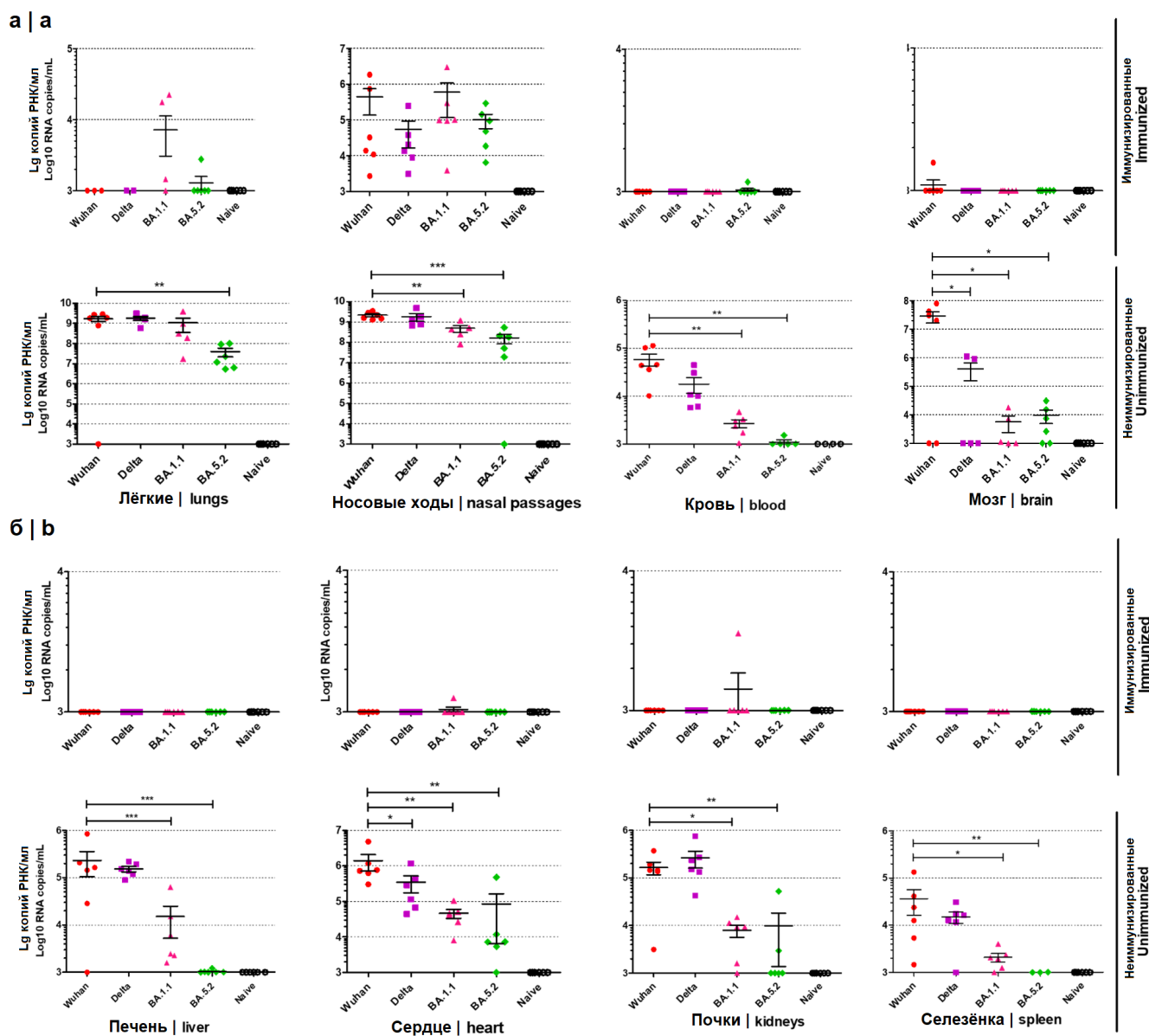
**Fig. 6.** Virus titer in lungs, nasal passages, and brain of immunized and unimmunized hamsters. The limit of detection was  $2.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ .

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ных животных (группы G1–G4) совокупный балл тяжести варьировал в среднем от 3,2 до 6,9 балла, в то время как у неиммунизированных животных (группы G5–G9) — от 20,8 до 49,8. Иммунизация хомячков штаммом D-D2 снижала совокупный балл тяжести при заражении штаммом Dubrovka в 15,7 раза ( $p < 0,01$ ), Podolsk — в 8,4 раза ( $p < 0,01$ ), Otradnoe — в 4,0 раза ( $p < 0,01$ ), FEB2 — в 5,7 раза ( $p < 0,01$ ). В то же время иммунизированные животные, заражённые Omicron-подобными штаммами Otradnoe и FEB2, имели значительно более высокие показатели гистопатологии лёгких ( $5,2 \pm 1,5$  и  $6,9 \pm 0,9$  балла

соответственно) по сравнению с хомячками, заражёнными родительским штаммом Dubrovka ( $3,2 \pm 0,1$  балла).

Однократная интраназальная иммунизация штаммом D-D2 защищала хомячков от развития продуктивной инфекции при заражении всеми штаммами SARS-CoV-2, о чём свидетельствует отсутствие инфекционного вируса в лёгких, носовых ходах и головном мозге всех животных групп G1–G4 (рис. 6). У всех неиммунизированных животных (группы G5–G8) развилась продуктивная инфекция, что проявлялось выделением вируса из лёгких



**Рис. 7.** Концентрация вирусной РНК в органах иммунизированных и неиммунизированных хомячков через 4 дня п.з.

*a* — лёгкие, носовые ходы, кровь и головной мозг; *b* — печень, сердце, почки и селезёнка.

Предел обнаружения — 3,0 lg копий РНК/мл. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**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<sub>10</sub> RNA copies/mL. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

и носовых ходов (рис. 6). Средние значения титра вируса в лёгких неиммунизированных животных варьировали от 4,57 до 7,28 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а в носовых ходах — от 4,78 до 6,74 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. В образцах головного мозга всех неиммунизированных хомячков группы G5, заражённых штаммом Dubrovka, обнаружен инфекционный вирус. Напротив, в образцах головного мозга животных из других групп инфекционный вирус не идентифицирован.

В лёгких, головном мозге, сердце, печени, почках, селезёнке и крови иммунизированных животных (группы G1–G4) вирусная РНК не была обнаружена у подавляющего большинства особей, за исключением отдельных хомячков, у которых РНК была обнаружена на пределе чувствительности метода. В носовых ходах иммунизированных животных содержание вирусной РНК было низким — в среднем 4,7–5,8 lg копий РНК/мл (рис. 7). Разница в содержании вирусной РНК в носовых ходах между группами иммунизированных и неиммунизированных хомячков варьировала в зависимости от штамма, использованного для заражения, от 2,9 до 5,5 lg: штамм Dubrovka — 3,7 lg ( $p < 0,001$ ), Podolsk — 4,5 lg ( $p < 0,05$ ), Otradnoe — 2,9 lg ( $p < 0,05$ ) и FEB2 — 3,2 lg ( $p < 0,05$ ).

В лёгких неиммунизированных животных (группы G5–G9) концентрация вирусной РНК варьировала в среднем от 7,60 до 9,25 lg, в носовых ходах — от 8,22 до 9,34 lg, в головном мозге — от 3,76 до 7,46 lg копий РНК/мл гомогената. В сердце, печени, почках, селезёнке и крови большинства неиммунизированных животных вирусная РНК также была обнаружена, но на более низком уровне, чем в лёгких и носовых ходах (от 3,02 до 6,15 lg копий РНК/мл гомогената; рис. 7). Примечательно, что при заражении штаммом FEB2 вирусная РНК не была обнаружена в печени и селезёнке ни у одного животного.

## Обсуждение

Наиболее выдающиеся достижения общественного здравоохранения связаны с массовым применением ЖАВ: глобальная ликвидация натуральной оспы, ликвидация полиомиелита в большинстве стран, многократное снижение заболеваемости корью, краснухой, эпидемическим паротитом, ротавирусным энтеритом и ветряной оспой. В связи с этим исследование потенциала ЖАВ в специфической профилактике COVID-19 представляется актуальным. В настоящей работе мы исследовали эффективность прототипа ЖАВ против COVID-19 (штамм D-D2) на золотистых сирийских хомячках при заражении как родительским, так и гетерологичными штаммами SARS-CoV-2.

Однократная интраназальная иммунизация сирийских хомячков *ca/ta/att* штаммом SARS-CoV-2 D-D2 показала его высокую иммуногенность — се-

роконверсия через 21 день п.и. наблюдалась у всех 24 иммунизированных животных (рис. 2, а). Титры антител к SARS-CoV-2 в сыворотках иммунизированных хомячков, измеренные методом ИФА с использованием в качестве иммуносорбента вирионов родительского штамма Dubrovka, составили в среднем  $5 \times 10^5$ . В то же время максимальной нейтрализующей активностью сыворотки обладали в отношении гомологичного Ухань-подобного штамма Dubrovka. Для гетерологичных штаммов, относящихся к вариантам Delta и Omicron, нейтрализующая активность была предсказуемо ниже или отсутствовала (рис. 2, б), что определяется изменениями антигенных свойств S-белка вируса в ходе эволюции и согласуется с результатами предыдущих исследований [2, 3, 15, 23, 24].

Несмотря на сниженную (или отсутствующую) нейтрализующую активность поствакцинальных антител против гетерологичных штаммов, иммунизация штаммом D-D2 защищала хомячков от заражения не только предковым штаммом Dubrovka, но и штаммами, принадлежащими к вариантам Delta и Omicron. Значительная защита от потери массы была продемонстрирована при заражении штаммом Dubrovka: на 4-й день п.з. иммунизированные животные прибавили в массе на 13% больше ( $p < 0,01$ ), чем неиммунизированные (рис. 3). Гетерологичные штаммы Podolsk, Otradnoe и FEB2 проявили меньшую вирулентность для сирийских хомячков, что отразилось в незначительном снижении массы неиммунизированных животных. В связи с этим защита иммунизированных животных от потери массы при заражении штаммами Podolsk, Otradnoe и FEB2 была незначительной — на 2–4%.

Более информативными при оценке эффективности иммунизации были уровни вирусной репродукции в лёгких и других органах, а также выраженность воспалительных изменений в лёгких. Отсутствие инфекционного вируса в основных органах-мишенях (лёгких, носовых ходах и головном мозге) у иммунизированных животных (группы G1–G4) на 4-й день п.з. позволяет нам охарактеризовать сформировавшийся иммунитет к SARS-CoV-2 как «стерильный». Этот вывод подтверждается тем фактом, что у подавляющего большинства иммунизированных животных вирусная РНК в гомогенатах лёгких, головного мозга, крови и других органов была ниже предела чувствительности ОТ-ПЦР-РВ (рис. 7). Вирусная РНК была обнаружена в носовых ходах всех иммунизированных животных, при этом её концентрация была на 2,9–4,5 lg ниже, чем у неиммунизированных животных (рис. 7, а). В то же время в носовых ходах иммунизированных хомячков не обнаружено инфекционного вируса (рис. 6). Возможным объяснением этого является то, что заражение проводилось путём инокуляции вируса непосредственно в носовые ходы, следовательно,

слизистая оболочка носа в первую очередь контактировала с вирусом и инфицировалась. В результате в клетках эпителия носа происходила ограниченная репликация вирусной РНК, но выделению инфекционного вируса, а также инфицированию лёгких и других органов препятствовали факторы приобретённого иммунитета.

Отсутствие репродукции вируса в лёгких иммунизированных животных согласуется с данными гистологии (рис. 4, 5). Слабо выраженные очаговые воспалительные изменения в бронхах, выявленные у иммунизированных хомячков, инфицированных гетерологичными штаммами Otradnoe и FEB2 (рис. 4, 5), вероятно, указывают на ограниченную репродукцию вируса в результате «ускользания» сублиний BA.1.1 и BA.5.2 варианта Omicron от адаптивного иммунитета, сформировавшегося после иммунизации Ухань-подобным штаммом. Таким образом, однократная интраназальная иммунизация сирийских хомячков штаммом D-D2 защищала животных от развития продуктивной инфекции и пневмонии не только при гомологичном, но и при гетерологичном заражении через 4 нед п.и.

Примечательно, что в сердце неиммунизированных животных, заражённых различными штаммами SARS-CoV-2, обнаружено значительное содержание вирусной РНК (до 6,0 Ig копий РНК/мл в группе, заражённой Ухань-подобным вирусом, — рис. 7, б). Эти результаты согласуются с данными других исследований, в которых были обнаружены патологические изменения, вирусная РНК и инфекционный вирус в сердце сирийских хомячков, заражённых SARS-CoV-2 [25, 26]. Эти данные имеют особое значение в контексте того факта, что COVID-19 увеличивает риск развития миокардита у людей [27, 28], что, вероятно, связано с повышенной экспрессией рецептора ACE2 в миоцитах человека [29].

Генетическая стабильность штамма D-D2 и возможность реверсии его вирулентности не исследовались. Поэтому мы рассматриваем штамм D-D2 не в качестве кандидата для разработки ЖАВ против COVID-19, а как модельный вакцинный штамм для изучения поствакцинального иммунитета.

Массовая вакцинопрофилактика COVID-19 показала, что лицензированные вакцины обладают низкой эффективностью при заражении штаммами, относящимися к варианту Omicron. Они обеспечивали необходимый уровень защиты от тяжёлого течения COVID-19 и смерти в период доминирования варианта Omicron [30, 31]. Однако поствакцинальная защита от инфицирования и симптоматической инфекции Omicron-подобными штаммами составляла всего 40–50% даже для мРНК вакцин (заявленных как наиболее эффективные) в первые 3 мес после вакцинации, после чего быстро снижалась до 10–20% [30–33]. Бустерная иммунизация была спо-

собна восстановить эффективность до исходных значений, но продолжительность защиты на данном уровне не превышала 3–6 мес [31, 32, 34–36]. Лицензированные вакцины (инактивированные, векторные, рекомбинантные и мРНК-вакцины) преимущественно основаны на S-белке SARS-CoV-2 и стимулируют как гуморальный, так и клеточный иммунитет [37–39]; однако в большей степени их эффективность определяется индукцией нейтрализующих антител. Изменчивость S-белка и появление новых эпидемиологически значимых вариантов вируса (VOC) приводит к «ускользанию» вируса из-под иммунологического надзора и снижению эффективности таких вакцин [2, 3, 23, 24, 40]. Более того, продолжающаяся эволюция варианта Omicron привела к появлению таких его сублиний, которые «ускользают» от адаптивного иммунитета, индуцированного даже предыдущим заражением вирусами родительских сублиний Omicron. Так, вирусы сублинии BF.7, BQ.1 и XBB (которые появились после сублинии BA.4/5) «ускользают» от нейтрализации антителами, антителозависимой клеточной цитотоксичности и фагоцитоза, индуцированных «прорывной» инфекцией вируса сублинии BA.1 [41]. Кроме того, вирусы сублинии BF.7 и BQ.1 обладают высокой устойчивостью к нейтрализации панелью из 77 моноклональных антител, которые эффективно нейтрализуют Ухань-подобный вирус [42].

Более высокая эффективность ЖАВ с интраназальным введением основана на тех же механизмах, которые участвуют в развитии адаптивного иммунитета при естественной респираторной вирусной инфекции [37, 43, 44]. Сочетанная активация гуморального и клеточного звеньев системной и мукозальной (местной) иммунной защиты способна обеспечивать эффективную защиту от инфекции SARS-CoV-2 [8, 37, 45]. Кроме того, иммунный ответ на ЖАВ развивается против всех вирусных белков — как структурных, так и неструктурных, что повышает её эффективность. Так, структурные белки М и N обладают высокой иммуногенностью и, наряду с неструктурными белками, более консервативны, чем S-белок. Многие Т-клеточные эпитопы филогенетически родственных видов коронавирусов и различных вариантов SARS-CoV-2 локализованы не только в S-белке [46, 47]. Так, J. Zhao и соавт., используя мононуклеары периферической крови, выделенные от пациентов с COVID-19, идентифицировали 5 иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов в N-белке SARS-CoV-2 [47]. Следует также отметить, что протективный иммунитет, опосредуемый Т-клетками, в меньшей степени зависит от мутаций, определяющих образование новых вариантов VOC SARS-CoV-2 [48, 49]. Действительно, появление новых вариантов VOC SARS-CoV-2 определяется главным образом мутациями в наиболее вариабельном S-белке, тогда как Т-клеточные



эпитопы присутствуют не только в S-белке, но и в более консервативных вирусных белках.

В недавних исследованиях иммуногенность и эффективность аттенуированных штаммов SARS-CoV-2 были исследованы на животных моделях коронавирусной инфекции на основе золотистых сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*), хомячков *Phodopus roborovskii* и трансгенных мышьях линии K18-hACE2. Обнаружено, что иммунизация восприимчивых животных аттенуированными штаммами SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную защиту от гомологичного заражения и развития пневмонии [9–17]. Однако потенциал перекрёстной протективной активности ЖАВ против гетерологичных вариантов вируса остаётся малоизученным. J. Trimpert и соавт. показали, что иммунизация аттенуированным SARS-CoV-2 приводит к развитию иммунитета у лабораторных животных при заражении не только родительским штаммом вируса, но и гетерологичными штаммами вариантов Alpha and Beta [50]. A. Yoshida и соавт. показали развитие перекрёстной защиты от заражения штаммом варианта Omicron (BA.1) у хомячков, иммунизированных рекомбинантным аттенуированным вирусом с геном S-белка варианта Omicron [13]. Наше исследование показало, что аттенуированный Ухань-подобный штамм SARS-CoV-2 способен обеспечить высокоэффективную защиту не только при гомологичном заражении, но и при заражении гетерологичными штаммами, относящимися к варианту Delta и сублиниям BA.1.1 и BA.5.2 варианта Omicron.

Перекрёстная защита, показанная в нашем исследовании, была предсказуемой, поскольку на момент проведения исследования было известно, что естественная SARS-CoV-2-инфекция предотвращает до 90% случаев повторного заражения вирусами вариантов Alpha, Beta и Delta и 56% случаев — вирусами варианта Omicron, тогда как большинство случаев повторного заражения происходит только через год после первичного заболевания [51]. Кроме того, защитная эффективность первичной инфекции против развития тяжёлого заболевания или смерти при повторном заражении Omicron-подобным вирусом составляет 97,3% (95% ДИ 94,9–98,6%), независимо от варианта вируса, вызвавшего первичную инфекцию [52]. Чрезвычайно низкий уровень тяжёлых и летальных случаев при повторном заражении указывает на то, что ЖАВ против COVID-19 потенциально способна обеспечить эффективную защиту от пневмонии и летального исхода, вызванных гетерологичными штаммами. Высокий потенциал ЖАВ для профилактики COVID-19 подтверждается наблюдением, что гибридный иммунитет (формируется при вакцинации с последующей «прорывной» инфекцией) и повторное заражение SARS-CoV-2 снижают риск последующего зараже-

ния, вызванного штаммами Omicron, на 60 и 85% соответственно [53]. Между тем «бустеризация» в результате «прорывной» инфекции Omicron-подобным вирусом индуцирует более высокие уровни В-клеток памяти и вирусспецифичных Т-клеток, особенно против штаммов Omicron, по сравнению с бустерной вакцинацией инактивированными или векторными вакцинами [54].

Примечательно, что практически все разработчики ЖАВ против COVID-19 демонстрируют эффективную защиту от заражения вирулентным штаммом при интраназальном способе введения [9–17]. В связи с этим показательным является успешное массовое применение таких «мукозальных» вакцин, как живая полиомиелитная и ротавирусная вакцины (пероральное введение) и живая гриппозная вакцина (интраназальное введение). Пероральное или интраназальное введение этих вакцин обеспечивает не только индукцию системного клеточного и гуморального адаптивного иммунного ответа, но и формирование мукозального (местного) иммунитета, включая секрецию специфических IgA-антител в слизистой оболочке дыхательных путей или кишечника. При интраназальной иммунизации с последующим заражением вирулентным штаммом специфические секреторные IgA-антитела нейтрализуют вирус непосредственно на слизистой оболочке дыхательных путей, являющейся «входными воротами» инфекции, подавляя его адгезивную способность и снижая эффективность трансмиссии [8, 55, 56].

## Заключение

Результаты настоящего исследования показали, что однократная интраназальная иммунизация сирийских хомячков аттенуированным Ухань-подобным штаммом SARS-CoV-2 обеспечивает высокоэффективную защиту животных от развития продуктивной инфекции и пневмонии при заражении не только гомологичным вирусом, но и гетерологичными штаммами, относящимися к вариантам Delta (AY.122) и Omicron (сублинии BA.1 и BA.5.2). Таким образом, аттенуация SARS-CoV-2 является перспективной стратегией для разработки высокоэффективной назальной живой вакцины против COVID-19.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Feikin D.R., Higdson 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)
2. 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>
3. 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>
4. Xiang T., Wang J., Zheng X. The humoral and cellular immune evasion of SARS-CoV-2 Omicron and sub-lineages. *Virology*. 2022;37(6):786–95.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virus.2022.11.007>
  5. 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>
  6. Chen J.M. Should the world collaborate imminently to develop neglected live-attenuated vaccines for COVID-19? *J. Med. Virology*. 2022;94(1):82–7.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.27335>
  7. Goławski M., Lewandowski P., Jabłońska I., Delijewski M. The reassessed potential of SARS-CoV-2 attenuation for COVID-19 vaccine development – a systematic review. *Viruses*. 2022;14(5):991. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14050991>
  8. 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>
  9. 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>
  10. 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>
  11. 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>
  12. 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>
  13. 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>
  14. 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>
  15. 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>
  16. 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>
  17. 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>
  18. Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Грачева А.В. и др. Биологическая характеристика холодаадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 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/ljgegh>
  19. 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 иммунобиологии*. 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>
  20. 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>
  21. 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>
  22. 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/rcmb.2020-0280LE>
  23. 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>
  24. 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>
  25. Daems M., Liesenborghs L., Boudewijns R., et al. SARS-CoV-2 infection causes prolonged cardiomyocyte swelling and inhibition of HIF1 $\alpha$  translocation in an animal model COVID-19. *Front. Cardiovasc. Med.* 2022;9:964512.  
DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.964512>
  26. 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>
  27. 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>
  28. 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>
  29. 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. Im-*

- munother.* 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-naive 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. Espíndola 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. Huiberts 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., Kleyhans 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>

### Информация об авторах

Файзулов Евгений Бахтиерович<sup>✉</sup> — к.б.н., зав. лаб. прикладной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; старший преподаватель кафедры вирусологии РМАНПО, Москва, Россия, [faizulov@mail.ru](mailto: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>

### Information about the authors

Evgeny B. Faizulov<sup>✉</sup> — 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, [faizulov@mail.ru](mailto:faizulov@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Anastasiya V. Gracheva — researcher, Applied virology laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <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/0009-0003-5745-7589>

*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

*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:** *Faizulov 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

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



## Ретроспективная оценка результатов иммунодиагностики туберкулёза у детей

Волкова Н.А.<sup>1,2</sup>, Михеева И.В.<sup>1✉</sup>, Мельникова А.А.<sup>1,3</sup>, Акимкин В.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Федеральная 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 туберкулёза 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/ypnlcn>

# Retrospective evaluation of the results of immunodiagnostics for tuberculosis in children

Natalia A. Volkova<sup>1,2</sup>, Irina V. Mikheeva<sup>1✉</sup>, Albina A. Melnikova<sup>1,3</sup>, Vasily G. Akimkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Moscow Hygiene and Epidemiology Center, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia

## Abstract

**Introduction.** For early immunodiagnostics 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 immunodiagnostics 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 immunodiagnostics 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>

## Введение

В контроле заболеваемости туберкулёзом (ТБ) важнейшим элементом является система ранней диагностики. Значение профилактических обследований с целью выявления ТБ особенно проявилось в период распространения COVID-19. По некоторым оценкам, в течение 3 лет, на протяжении которых длилась пандемия, перебои в системе активного скрининга на ТБ привели к несвоевременному выявлению 2011 больных ТБ (1,5% от общего числа впервые идентифицированных больных ТБ) [1].

Поскольку инфицирование возбудителем ТБ, как правило, происходит в детском и подростковом возрасте и случаи манифестации инфекционного процесса у взрослых связаны с активизацией латентной инфекции, фундаментом системы раннего выявления ТБ служит скрининг детского населения. За более чем столетний период сложилась чёткая система выявления ТБ у детей с помощью кожных иммунологических проб [2–4].

В последние десятилетия появились методы диагностики ТБ *in vitro*, в основе которых лежит ко-

личественное определение интерферона- $\gamma$ , высвобождающегося при контакте эффекторных Т-лимфоцитов со специфическими антигенами ESAT-6. Однако при высокой специфичности данные тесты имеют существенные недостатки: высокая стоимость, зависимость от поставок импортных материалов, необходимость наличия специально оборудованной лаборатории и соблюдения при заборе крови предосторожностей для сохранения жизнеспособности лимфоцитов, продуцирующих интерферон- $\gamma$ , а также проведения внутривенных манипуляций, что особенно ограничивает применение данного теста у детей [5, 6]. В связи с этим алгоритм диагностики инфицирования микобактериями ТБ принципиально не изменился и для скрининга по-прежнему используются кожные диагностические пробы [7].

В течение десятилетий скрининговое обследование детей на ТБ проводилось с помощью пробы Манту (ПМ), с 2009 г. в некоторых регионах, а с 2013 г. массово применяется проба с антигеном туберкулёзным рекомбинантным (АТР) [8, 9].

Показаны высокая чувствительность и специфичность пробы с АТР при использовании его у пациентов с клинико-рентгенологическими признаками ТБ органов дыхания [10–12]. Однако проба с АТР может быть отрицательной у лиц на ранних стадиях инфицирования микобактериями ТБ, у больных ТБ с выраженными иммунопатологическими нарушениями, обусловленными тяжёлым течением туберкулёзного процесса, а также у лиц, имеющих сопутствующие заболевания, сопровождающиеся иммунодефицитным состоянием, что особенно актуально в условиях распространения новой коронавирусной инфекции [1, 13, 14].

Исследованию и оценке результатов ПМ и пробы с АТР посвящено множество работ [9, 11, 15]. На огромном материале (10,5 млн детей в Москве в течение 7 лет) установлены параметры туберкулинодиагностики: внутрикожная ПМ с 2 ТЕ (туберкулиновыми единицами) ППД-Л (очищенного протеинового деривата в модификации Линниковой). Чувствительность метода составила 94,7%, специфичность — 41,7%. Вероятность отсутствия заболевания при отрицательном тесте — 99,9%. Вероятность наличия заболевания у ребёнка при положительном тесте — 0,01% [16, 17], тогда как отрицательные реакции на АТР могут определяться у лиц с неактивной инфекцией ТБ [18, 19] и на ранних стадиях инфицирования микобактериями ТБ [4, 19].

При выборе тестов для скрининга в первую очередь оценивают их чувствительность. Чувствительность теста — его способность достоверно определять наличие данного заболевания у обследуемого лица. Другими словами, чувствительные тесты не должны «пропускать» больных, хотя при этом почти неизбежно в ряде случаев болезнь будет

ошибочно «приписана» условно здоровым лицам. Чувствительные тесты рекомендуют использовать на ранних стадиях диагностического поиска для сужения его рамок, когда возможных вариантов много и диагностические тесты позволяют исключить некоторые из них. Следует отметить, что в клинической практике особенно информативен отрицательный результат чувствительного теста [20].

Несмотря на различия в чувствительности и специфичности ПМ с 2 ТЕ ППД-Л и АТР, не позволяющие считать данные методы взаимозаменяемыми, в приказе Минздрава России № 951 от 29.12.2014<sup>1</sup> была утверждена замена ПМ на пробу с АТР при скрининге на ТБ у детей в возрасте 8 лет и старше. Данные рекомендации противоречили действующим в то время санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.2.3114-13 «Профилактика туберкулёза»<sup>2</sup>, однако часть субъектов Российской Федерации начала проводить скрининг с использованием пробы с АТР [4]. На этом фоне повысилась заболеваемость ТБ в IIIA подгруппе и во всех подгруппах VI группы диспансерного учёта (ГДУ), что может быть обусловлено отменой превентивного лечения детей этих ГДУ при отрицательной реакции на АТР [4, 19, 21].

Таким образом, накопленный за десятилетие опыт массового применения пробы с АТР нуждается в объективном анализе и оценке, поскольку до сих пор у специалистов (фтизиатров, педиатров, эпидемиологов), нет единого мнения о целесообразности её использования в качестве альтернативы ПМ [4, 7, 18, 21].

В этой связи было проведено исследование, целью которого являлась ретроспективная оценка результатов иммунодиагностики ТБ у детей с впервые выявленным активным ТБ с использованием ПМ и пробы с АТР.

## Материалы и методы

Проведено ретроспективное аналитическое обсервационное когортное исследование. Материалами для исследования являлись данные, поступившие в Роспотребнадзор из противотуберкулёзных учреждений в субъектах Российской Федерации в соответствии с запросом № 01/5300-15-27 от 18.05.2015 «О представлении информации об обследовании детей на туберкулез» и письмом Роспотребнадзора № 01/7238-15-27 от 06.06.2017 «О результатах исследования сравнительной эф-

<sup>1</sup> Приказ Министерства здравоохранения РФ от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».

<sup>2</sup> Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 22.10.2013 № 60 (ред. от 14.09.2020) «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.2.3114-13 "Профилактика туберкулёза" (вместе с "СП 3.1.2.3114-13...")».

**Таблица 1.** Результаты ПМ и пробы с АТР у впервые выявленных больных активным ТБ детей в 2013–2018 гг.  
**Table 1.** Results of MT and RTA assay in newly diagnosed active pediatric TB patients in 2013–2018

Год   Year	Всего детей с впервые выявленным активным ТБ Total children with newly diagnosed active tuberculosis	Из них с результатами ПМ с 2 ТЕ и пробы с АТР Of these with the results of the Mantoux test with 2 TE (MT) and the test with RTA							
		ПМ+ АТР– MT+ RTA–		ПМ+ АТР+ MT+ RTA+		ПМ– АТР– MT– RTA–		ПМ– АТР+ 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
Всего   Total	12 902	861	6,7	11 673	90,5	198	1,5	170	1,3

**Примечание.** Здесь и в табл. 2, 3: «+» — положительный результат; «–» — отрицательный результат.  
**Note.** Here and in the Tables 2 and 3: "+" — positive result; "-" — negative result.

фективности пробы Манту (ПМ) и пробы с аллергеном туберкулезом рекомбинантным (АТР)». Данные включали сведения о результатах ПМ с 2 ТЕ ППД-Л и пробой с АТР у впервые выявленных в 2013–2018 гг. больных детей с активным и неактивным ТБ. «Неактивным» считали ТБ у детей, учтённых в Ш ГДУ (лица с клинически излеченным ТБ, с большими и малыми остаточными изменениями)<sup>3</sup>. Дополнительно проведён анализ результатов иммунодиагностики с использованием ПМ и АТР у больных активным ТБ детей и подростков (0–17 лет) в Москве в 2018–2022 гг. по данным, полученным из противотуберкулёзных учреждений города. 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).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов параметрической статистики с определением стандартной ошибки относительной величины. Достоверность различий сравниваемых относительных величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Разность результатов считали статистически значимой при  $p < 0,05$ .

<sup>3</sup> Приказ МЗСР РФ от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации»; Приказ Минздрава России от 13.03.2019 № 127н «Об утверждении порядка диспансерного наблюдения за больными туберкулёзом, лицами, находящимися или находившимися в контакте с источником туберкулёза, а также лицами с подозрением на туберкулёз и излеченными от туберкулёза и признании утратившими силу пунктов 16–17 Порядка оказания медицинской помощи больным туберкулёзом, утверждённого приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 15 ноября 2012 г. № 932н».

## Результаты

По данным противотуберкулёзных учреждений, в 2013–2018 гг. впервые выявлено 12 902 ребёнка, больных активным ТБ<sup>4</sup>.

У абсолютного большинства больных ( $n = 11 673$ ; 90,5%) результат обеих кожных проб был положительным (табл. 1). У 198 (1,5%) детей с активным ТБ обе пробы дали отрицательный результат. Отрицательный результат пробы с АТР при положительной ПМ выявлен у 861 (6,7%) больного, а положительный результат при отрицательной ПМ — у 170 (1,3%). Следовательно, чувствительность пробы с АТР при выявлении активного ТБ составила 91,3%, а чувствительность ПМ — 97,2% ( $p < 0,01$ ). За 2013–2018 гг. у 1059 впервые выявленных детей, больных активным ТБ, проба с АТР показала отрицательный результат. Следовательно, при отказе от ПМ и переходе на скрининг с использованием пробы с АТР возрастёт количество пропущенных и не диагностированных своевременно случаев активного ТБ у детей.

Аналогичные данные были получены при анализе результатов кожных проб у впервые выявленных в тех же регионах России в 2014–2018 гг. детей с неактивным ТБ (табл. 2). У абсолютного большинства больных ( $n = 12 953$ ; 91,7%) отмечен положительный результат обеих кожных проб, у 101 (0,7%) ребёнка — отрицательный. Отрицательный результат пробы с АТР при положительной ПМ выявлен у 775 (5,5%) больных, положительный результат пробы с АТР при отрицательной ПМ — у 495 (3,5%). Таким образом, при выявлении неактивного ТБ чувствительность ПМ оказалась выше, чем пробы с АТР, и составила 97,2%, а чувствительность пробы

<sup>4</sup> Данные получены из 57–81 субъекта Российской Федерации в разные годы.



**Таблица 2.** Результаты ПМ и пробы с АТР у впервые выявленных больных неактивным ТБ детей в 2014–2018 гг.**Table 2.** Results of MT and RTA assay in newly diagnosed inactive pediatric TB patients in 2014–2018

Год   Year	Всего детей с впервые выявленным неактивным ТБ Total children with newly diagnosed inactive tuberculosis	Из них с результатами ПМ с 2 ТЕ и пробы с АТР Of these with the results of the Mantoux test with 2TE (MT) and the test with RTA							
		ПМ+ АТР– MT+ RTA–		ПМ+ АТР+ MT+ RTA+		ПМ– АТР– MT– RTA–		ПМ– АТР+ 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
Всего   Total	14 127	775	5,5	12 953	91,7	101	0,7	495	3,5

**Таблица 3.** Результаты ПМ и пробы с АТР у впервые выявленных больных активным ТБ детей в Москве в 2017–2022 гг.**Table 3.** Results of MT and RTA assay in newly diagnosed active TB patients in Moscow in 2017–2022

Год   Year	Всего детей с впервые выявленным активным ТБ Total children with newly diagnosed active tuberculosis	Из них с результатами ПМ с 2ТЕ и пробы с АТР Of these with the results of the Mantoux test with 2TE (MT) and the test with RTA							
		ПМ+ АТР– MT+ RTA–		ПМ+ АТР+ MT+ RTA+		ПМ– АТР– MT– RTA–		ПМ– АТР+ 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
Всего   Total	240	13	5,4	217	90,4	6	2,5	4	1,7

с АТР — 95,2% ( $p < 0,01$ ). За 2014–2018 гг. у 876 впервые выявленных детей с неактивным ТБ проба с АТР показала отрицательный результат. Следовательно, при отказе от ПМ и переходе на скрининг с использованием пробы с АТР возрастёт количество пропущенных и не диагностированных своевременно случаев неактивного ТБ у детей.

В связи с отменой в 2018 г. применения ПМ у детей старше 7 лет<sup>5</sup> продолжение исследования в масштабе страны стало невозможным. Однако благодаря данным, полученным из противотуберкулёзных учреждений столицы, удалось ретроспективно провести оценку результатов иммунодиагностики с использованием ПМ и пробы с АТР у больных активным ТБ детей и подростков (0–17 лет) в 2017–2022 гг. в Москве.

Всего за 6 лет было зарегистрировано 515 случаев активного ТБ у детей, данные эпидемиологиче-

ского расследования были представлены о 447 случаях. При этом обе кожные пробы проведены только у 240 человек, что существенно затруднило сравнительный анализ. Из 240 детей с активным ТБ у 217 (90,4%) результат ПМ и пробы с АТР был положительным, у 6 (2,5%) — отрицательным (табл. 3). Положительный результат туберкулинодиагностики при отрицательной пробе с АТР был получен у 13 (5,4%) детей. При этом проба с АТР была отрицательной у детей с диагнозами: очаговый ТБ, инфильтративный ТБ лёгких, ТБ внутригрудных лимфатических узлов. Положительный результат пробы с АТР при отрицательной ПМ был зафиксирован только у 4 (1,7%) детей. Несмотря на то что чувствительность ПМ при выявлении активного ТБ оказалась выше, чем у пробы с АТР (95,8% против 92,1%), статистическую достоверность разности этих показателей показать не удалось вследствие малого числа наблюдений в 2022 г. (всего 17 случаев с результатами обеих проб). Если же провести анализ данных за 2017–2021 гг., то разница в чувствительности ПМ и пробы с АТР оказывается достоверной ( $p < 0,05$ ).

<sup>5</sup> См.: Скрининговое обследование детей и подростков с целью выявления туберкулёзной инфекции: методическое руководство. М.; 2018. 48 с.

## Обсуждение

Результаты проведённого анализа подтвердили ранее опубликованные данные о том, что проба с АТР может давать ложноотрицательные результаты на ранних этапах инфицирования микобактериями ТБ и начальном этапе развития туберкулёзного процесса, что не позволяет, в отличие от ПМ, полноценно формировать группы риска, выявлять заболевание на ранних этапах его развития и повышает вероятность пропуска заболевания [21, 22].

Ещё на этапе апробации препарата АТР его исследователи [23] наблюдали у больных активным ТБ только 84,2% (95% ДИ 79,7–88,8) положительных результатов данной пробы, а у детей и подростков ( $n = 200$ ) с активным ТБ органов дыхания после первой фазы химиотерапии — 94,5% (95% ДИ 83,0–97,9). При этом реакция на ПМ была положительной у всех 200 детей этой подгруппы. Необходимо отметить, что авторы на основании приведённых количественных данных сделали вывод об одинаковой чувствительности ПМ и пробы с АТР, несмотря на статистически достоверную разность показателей чувствительности ( $p < 0,05$ ) [23].

Отрицательную реакцию на пробу с АТР ряд исследователей наблюдали у 13–20% заболевших ТБ детей, в том числе с вторичными формами ТБ и распространёнными процессами, включая случаи с бактериовыделением [4, 9, 15, 24, 25].

Аналогичные данные были получены Ю.А. Яровой и соавт. [19], которые отмечали, что заболевание ТБ у детей с отрицательными результатами пробы с АТР протекало в виде осложнённых форм первичного периода в  $45,5 \pm 15,0\%$  случаев, неосложнённых форм — в  $27,3 \pm 13,4\%$  случаев, генерализованного поражения — в  $27,3 \pm 13,4\%$  случаев.

По другим данным, среди детей с ТБ с отрицательными реакциями на введение АТР больные с активными формами ТБ составляли 20,4%. М.Э. Лозовская и соавт. подчёркивали, что массовая туберкулинодиагностика является ведущим методом выявления пациентов с отрицательными результатами пробы с АТР, благодаря которому ТБ был диагностирован в  $70,4 \pm 8,8\%$  случаев, у детей с остаточными посттуберкулёзными изменениями — в  $93,8 \pm 4,7\%$  [22].

По данным широкомасштабного ретроспективного наблюдения в 65 регионах РФ [26], частота положительных реакций на введение АТР у детей с активным ТБ, состоящих в I ГДУ) составляла более 90% (в 2010 г. — 92,1%, в 2011 г. — 90,1%, в 2012 г. — 92,8%), что практически полностью совпадает с результатами настоящего исследования.

Итоги метаанализа опубликованных результатов применения пробы с АТР в течение 10 лет также показали, что доля положительных реакций пробы с АТР у больных ТБ детей в возрасте до 14 лет

включительно была ниже (93,5%) по сравнению с ПМ, которая показывала положительный результат в 97,9% случаев ( $p = 0,688$ ) [11]. При этом в большинстве исследований пробы с АТР, а также согласно клиническим рекомендациям [29], детям с положительным её результатом проводилась компьютерная томография (КТ), поэтому чувствительность пробы с АТР приравнивали к чувствительности КТ, в то время как детей с подозрением на ТБ по результатам ПМ на КТ не направляли до тех пор, пока реакция на АТР у них не будет положительной [23, 28–30]. Кроме того, согласно инструкции к препарату «Диаскинтест», обследованию на ТБ подлежат лица не только с положительной, но и с сомнительной реакцией на пробу с АТР<sup>6</sup>. Однако несмотря на все принятые изначально регламентирующие меры по повышению чувствительности пробы с АТР при выявлении ТБ, результаты её применения на практике показали, что по чувствительности она уступает ПМ.

По нашим предварительным оценкам, в целом по России при переходе на скрининг с использованием только пробы с АТР количество пропущенных случаев активного ТБ у детей составило бы около 300 в год [31]. Поэтому в алгоритме выявления и диагностики ТБ проба с АТР и ПМ не могут быть взаимозаменяемыми и дополняют друг друга. ПМ позволяет определить наличие инфицирования микобактериями ТБ и включить пациента в группу риска по ТБ, обладает широким спектром диагностических возможностей в динамике. Проба с АТР имеет диагностическую ценность и востребованность в группах риска по развитию ТБ (контакт, изменение чувствительности на ПМ, социальные предпосылки, заболевания со сходной клинико-рентгенологической картиной) [21].

## Выводы

1. У 6,2–7,9% впервые выявленных детей, больных активным ТБ, проба с АТР была отрицательной, в то время как отрицательный результат ПМ выявлен только у 2,8–4,2% из них, т.е. чувствительность ПМ при скрининге детей на ТБ выше, чем проба с АТР. За период с 2013 по 2018 г. у 1059 впервые выявленных детей, больных активным ТБ, проба с АТР показала отрицательный результат. Следовательно, при отказе от ПМ и переходе на скрининг с использованием пробы с АТР возрастёт количество пропущенных и не диагностированных своевременно случаев активного ТБ у детей.

2. Отрицательный результат пробы с АТР при положительном результате ПМ не может быть гарантией отсутствия активного ТБ у ребёнка, в том числе с бактериовыделением, и требует дополнительного обследования.

<sup>6</sup> Диаскинтест. URL: <http://www.diaskintest.ru>

3. Для скрининга детей на ТБ следует использовать ПМ как более чувствительный тест. В настоящее время ПМ не может быть исключена из алгоритма ранней диагностики ТБ у детей и подростков.

## 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. Слогодская 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/rkscabt>
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/unrnrdx>
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 легких*. 2019;97(9):59–66. Aksenova 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. Слогодская 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/vldhnp>
8. Старшинова А.А., Довгало 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. Слогодская 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/zgvoowl>
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., Pupyshv 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., Довгало 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/xoqfut>
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.Я. 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.YA., 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., Stakheeva 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*. М.;2014. Shilova M.V. *Tuberculosis in Russia in 2012–2013*. Moscow;2014. EDN: <https://elibrary.ru/wecjvl>
19. Яровая Ю.А., Лозовская М.Э., Ключкова 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, Tubiniferon 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. Слогодская 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/nwyxod>
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., Александру 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/nwyxar>
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>

#### 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<sup>✉</sup> — д.м.н., профессор, зав. лаб. иммунопрофилактики ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [irina\\_mikheeva@mail.ru](mailto:irina_mikheeva@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8736-4007>

#### 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<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of immunoprophylaxis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [irina\\_mikheeva@mail.ru](mailto: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

*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



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

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

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

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика;

<sup>3</sup>Международный 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-позитивных 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 rs-H5D (27,08%), rs-W28\* (35,21%), c-E64D (33,54%), c-L116I/V/G (91,46%), c-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*. 2024;101(1):61–71.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-447>

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

Original Study Article  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-447>

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

Yulia V. Ostankova<sup>1✉</sup>, Thierno A.L. Balde<sup>2</sup>, Sanaba Boumbaly<sup>3</sup>, Elena N. Serikova<sup>1</sup>, Elena B. Zueva<sup>1</sup>, Diana E. Reingardt<sup>1</sup>, Alexandr N. Schemelev<sup>1</sup>, Vladimir S. Davydenko<sup>1</sup>, Ekaterina V. Anufrieva<sup>1</sup>, Elena V. Esaulenko<sup>1</sup>, Areg A. Totolian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;

<sup>3</sup>Centre 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>

## Введение

Вирус гепатита В (ВГВ), способный вызывать как острое, так и хроническое заболевание печени и являющийся 7-й причиной смертности в мире, остаётся серьёзной проблемой общественного здравоохранения, несмотря на все меры, принимаемые для его элиминации. По данным разных исследо-

вателей, количество больных хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ) в мире достигает 360 млн человек<sup>1</sup>. Более 75 млн из них проживает в странах Африки к югу от Сахары, где встречаемость среди

<sup>1</sup> ВОЗ. Гепатит В: Информационный бюллетень; 2023. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

населения поверхностного антигена ВГВ (HBsAg), представляющего собой главный лабораторный диагностический маркер, превосходит 8%, а в некоторых регионах достигает 25% [1]. К естественным путям передачи патогена относят половой (прямой сексуальный контакт), вертикальный (от матери плоду во время или после родов, а также пренатальное (трансплацентарное) инфицирование, бытовой путь, в том числе прямой и не прямой, включающий пользование общими с инфицированным лицом предметами гигиены и тому подобные контакты. Одним из наиболее значимых путей распространения ВГВ в Африке является вертикальный [2]. Без терапевтического вмешательства частота передачи вируса от матери к ребёнку превышает 31% [3]. Особая значимость раннего инфицирования связана с тем, что при заражении в возрасте до 5 лет в подавляющем большинстве случаев развивается ХГВ [4]. Кроме того, именно раннее инфицирование ВГВ является одним из наиболее значимых факторов риска развития цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [5]. Ещё одной причиной огромного количества больных ГЦК и высокой смертности от неё в Африке является позднее выявление заболевания и, соответственно, позднее обращение больных в медицинские учреждения [6]. Самой пострадавшей страной является Гамбия, за ней следуют Гвинейская Республика, Либерия и Сьерра-Леоне [7]. Связано это как с недостаточностью методов диагностики, так и с крайне низкой информированностью населения о вирусных гепатитах, путях передачи и последствиях инфицирования. Помимо социальных факторов на прогрессирование заболевания способны влиять вирусные факторы. Так, высокая вирусная нагрузка и, соответственно, активная репликация вируса повышают риск развития ЦП и ГЦК, но даже вирусная нагрузка менее 200 МЕ/мл не исключает прогрессирования болезни [8]. Высокая гетерогенность вируса, для которого в настоящее время описаны 10 генотипов и более 40 субгенотипов, также оказывает влияние на прогрессирование заболевания [9, 10]. Например, для ВГВ субгенотипа С2 характерны более частая хронизация и тяжёлое течение болезни, включая развитие ГЦК, чем для В2, а вирусы генотипов А и В более чувствительны к терапии, чем D и C [11].

Однако генотипический фактор не является единственным параметром, способствующим прогрессированию заболевания, весомый вклад вносят естественные и возникающие под селективным воздействием мутации вируса. За исключением редких случаев делеций, большинство мутаций в preCore/Core-регионе представляют собой точечные мутации, преимущественно связанные со снижением уровня HBsAg и/или снижением вирусной нагрузки. Причём в Core-регионе мутации локализируются в основном в иммуноактивных областях (МНС классов I + II) и,

таким образом, могут влиять на развитие заболевания. Например, известны связанные с тяжёлым течением заболевания печени и развитием ГЦК мутации в preCore-регионе (*G1896A*) и в базальном ядерном промоторе (basal core promoter — BCP) — *T1753C*, *A1762T/G1764A*, описаны также аминокислотные замены в Core-регионе — *F24Y*, *E64D*, *E77Q*, *A80I/T/V*, *L116I*, *E180A* [12]. Молекулярно-генетическая вариативность вирусов может проявлять связь с пространственно-временными изменениями, т.е. эволюционировать с течением времени, распространением в географических регионах, группах риска, ключевых группах населения, изменением путей передачи [13]. Поэтому для прогнозирования эпидемиологической ситуации высокую значимость имеет динамический мониторинг циркулирующих вариантов вируса в группах населения, отражающих ситуацию в популяции, а также потенциально способных распространять патоген. Беременные женщины являются такой группой, т.к. фактически демонстрируют эпидемиологический профиль половозрелого гетеросексуального населения того или иного исследуемого географического региона.

Гвинейская Республика — страна с населением более 13,6 млн человек, расположенная на Атлантическом побережье Западной Африки, являющаяся одной из беднейших стран мира<sup>2</sup>, где медицина остаётся наименее финансируемым государством направлением. Так, в 2019 г. вклад ВВП страны в секторы здравоохранения и социальной работы не превышал 3,2%<sup>3</sup>. Значительно сократилась работа по профилактике вертикальной передачи ВИЧ, являющаяся одним из ключевых факторов улучшения здоровья матери и ребёнка, уменьшилось среднее число посещений клиник дородовой помощи [14, 15]. В то же время распространённость ВГВ в стране крайне велика: в отличие от ВИЧ, анализ на маркеры вирусных гепатитов проводят редко, даже при дородовом обследовании беременных, поэтому у большинства больных заболевание не диагностировано. Поскольку скрининг на вирусные гепатиты не проводят, то и профилактики вертикальной передачи ВГВ не осуществляют. Встречаемость ДНК ВГВ среди условно здоровых лиц составляет 22,36% [16], среди доноров крови — 30,4% [17], а среди беременных женщин в некоторых регионах страны — 26,5% [18, 19]. Ранее было показано, что практически все HBsAg-позитивные женщины, родившие естественным путём, передавали вирус ребёнку [20].

Несмотря на внедрение в стране вакцинации против ВГВ в 2006 г., охват вакцинацией в настоя-

<sup>2</sup> Countrymeters. Население Гвинеи. URL: <http://countrymeters.info/ru/guinea> (дата обращения: 09.03.2023).

<sup>3</sup> INS GUINÉE. Annuaire Statistique; 2019. URL: [https://www.stat-guinee.org/images/Documents/Publications/INS/annuelles/annuaire/ANNUAIRE\\_STATISTIQUE\\_AGRICOLE\\_2019\\_INS\\_FINALISE.pdf](https://www.stat-guinee.org/images/Documents/Publications/INS/annuelles/annuaire/ANNUAIRE_STATISTIQUE_AGRICOLE_2019_INS_FINALISE.pdf) (дата обращения: 20.12.2022).



щее время не превышает 47% жителей, что связано как с отсутствием налаженной системы хранения и транспортировки вакцин, требующих соблюдения холодовой цепи, так и с социокультурными особенностями населения, недоверием местных жителей к медицинскому персоналу [21].

Данных о молекулярно-генетических особенностях циркулирующего в Гвинейской Республике вируса сравнительно мало, характеристика preCore/Core-региона представлена в литературе очень ограниченно [22].

**Целью** нашей работы было проанализировать вариабельность preCore/Core-региона ВГВ, циркулирующего среди беременных женщин в Гвинейской Республике.

### Материалы и методы

В работе были использованы образцы плазмы крови, полученные от 480 инфицированных ВГВ беременных женщин, проживающих в Гвинейской Республике [19]. Лабораторные исследования проводили на базе Российско-Гвинейского научного исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, расположенного на территории Института прикладной биологии Гвинеи в префектуре Киндия. На проведение данного этапа работы было получено согласие Этического комитета Гвинеи (протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015). Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

ДНК ВГВ в плазме крови определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией, применяя разработанный в Санкт-Петербургском НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера способ, позволяющий обнаруживать ДНК ВГВ при низкой вирусной нагрузке. Чувствительность метода составляет 10 МЕ/мл при экстракции из 100 мкл плазмы [23]. Нуклеотидные последовательности полных геномов ВГВ получали, используя гнездовую ПЦР на базе перекрывающихся пар праймеров с последующим секвенированием по Сэнгеру [22]. Полученные последовательности ВГВ были проанализированы с целью определения мутаций в исследуемом регионе генома ВГВ относительно консенсусной последовательности вируса Mart-B47 (HE974377.1, генотип D) [23] для единообразия обозначения позиций замен и выявления замен, характерных для одних генотипов, но не представленных или мало представленных в других. Дополнительно все последовательности генотипов А, D и E анализировали относительно референсных последовательностей соответствующих генотипов (номера в международной базе GenBank — AY128092.1, NC\_003977.2 и AB032431.1 соответственно). Использовали онлайн-инструмент базы

данных «Geno2Pheno HBV»<sup>4</sup>, а также «Hepatitis B Virus Phylogenetic Typing Tool»<sup>5</sup>, где в качестве референсных штаммов из предложенных выбирали также AY128092.1, NC\_003977.2 и AB032431.1.

Статистическую обработку данных производили с помощью программ «MS Excel», «Prizm 5.0» («GraphPad Software Inc.»), «Statistica 8.0» («StatSoft Inc.»). При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представлены с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ). Для оценки достоверности различий данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности  $p < 0,05$ .

### Результаты

Возраст обследованных варьировал от 13 до 55 лет и составил в среднем 25,8 года. Число HBsAg-негативных случаев составило 188 (39,17%; 95% ДИ 34,77–43,69%). Генотипы ВГВ, определённые на основании филогенетического анализа, представлены в **табл. 1** [19].

Для изучения вариабельности preCore/Core-региона ВГВ в обследованной группе были проанализированы нуклеотидные последовательности вирусного генома каждого образца. Аминокислотная изменчивость preCore-региона определена у 211 человек (43,96%; 95% ДИ 39,46–48,53%), а Core-региона — у 473 (98,54%; 95% ДИ 97,02–99,41%). При анализе preCore-региона выявлены 12 полиморфных участков, в которых происходили аминокислотные замены, в том числе для генотипа E определены 8 позиций, для генотипа D — 5, для генотипа А — 2. Встречаемость аминокислотных замен в preCore-регионе представлена на **рис. 1**.

При сравнительном анализе установлено, что распределение мутаций среди ВГВ генотипов E, A и D значительно отличаются ( $p < 0,0001$ ). Для генотипа E среди прочих определены замены *H5D*, *L8Q*, *C12R*, не представленные среди изолятов генотипов A и D. В свою очередь, мутация *V17L/I* показана только для ВГВ генотипа A, замены *A19T*, *S20F*, *L27V* выявлены только у ВГВ генотипа D. При анализе распределения аминокислотных замен, представленных, по крайней мере, в 2 генотипических группах, также определены достоверные отличия с преобладанием мутаций среди ВГВ генотипа E:  $\chi^2 = 16,206$ ;  $df = 8$ ;  $p = 0,0395$ .

В Core-регионе определены 67 позиций аминокислотных замен, в том числе для генотипа E — 46, для генотипа A — 23 позиции, для генотипа D — 26.

<sup>4</sup> URL: <https://hbv.geno2pheno.org/>

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

**Таблица 1.** Генотипы ВГВ, циркулирующие среди беременных женщин обследованной группы

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

Генотип Genotype	Количество Quantity	Доля, % Share, %	95% ДИ 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

Встречаемость наиболее распространённых аминокислотных замен в Core-регионе представлена на рис. 2.

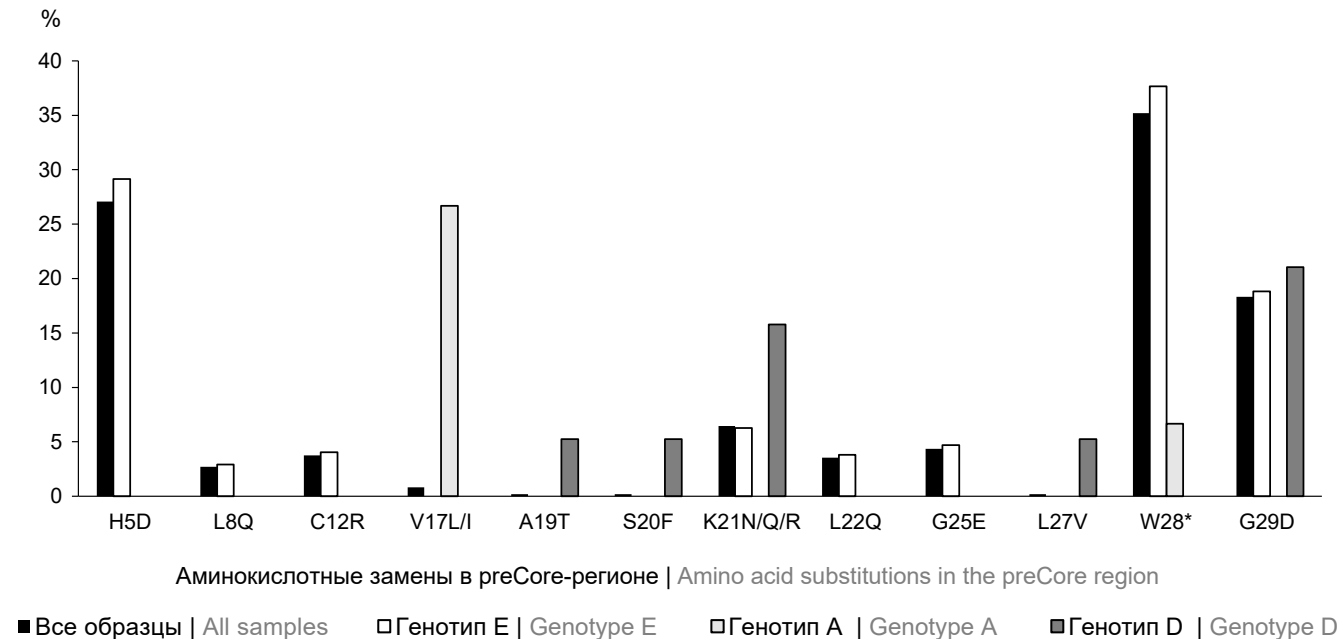
Распределение мутаций Core-региона среди ВГВ генотипов E, A и D также значительно отличается ( $p < 0,0001$ ). Для генотипа E выявлены замены S21H, V27I, R28K, Y38F, R39G, E46D, P79Q, M93V/I, G94A, F103L, I105T, T114P/V, F122C, W125T, R133T, S141P, L143T, T146N, V149I, R152G, R166P, R181P, Q184R/K/H, не представленные среди образцов ВГВ генотипов A и D. Только среди ВГВ генотипа A обнаружены мутации A11S, A34S, G63V, E77D/Q, L95I, T142I/S, D153G,

R159G, S183P, среди ВГВ генотипа D — I3L, D4Y, F9I, V13G, L15F, S17L, L19F, D29G, Q57R, L162N, S178T. Оценка распределения полиморфных вариантов, выявленных не менее чем в 2 генотипических группах, продемонстрировала достоверные ( $p < 0,0001$ ) отличия с большей частотой встречаемости и разнообразием замен среди ВГВ генотипа E. Сравнительный межгенотипный анализ встречаемости наиболее распространённых в обследованной группе аминокислотных замен в Core-регионе также показал отличия ( $p < 0,0001$ ).

Двойная мутация A1762T/G1764A была выявлена в ВСР 74 образцов ВГВ генотипа E, что составило 15,42% (95% ДИ 12,3–18,96%) от общей группы и 16,59% (95% ДИ 13,26–20,38%) от пациентов с ВГВ генотипа E. Информация о наиболее часто встречающихся в группе клинически значимых мутациях ВСР и preCore/Core-региона представлена в табл. 2.

## Обсуждение

Ген C и регион Pre-C протяжённостью 555 н.т. и 87 н.т. соответственно кодируют два белка: HBeAg размером 185 аминокислот и HBeAg размером 150 аминокислот, являющихся продуктом альтернативной инициации трансляции с двух AUG-кодонов и посттрансляционной модификации. С внутренне-го AUG-кодона строится структурный полипептид

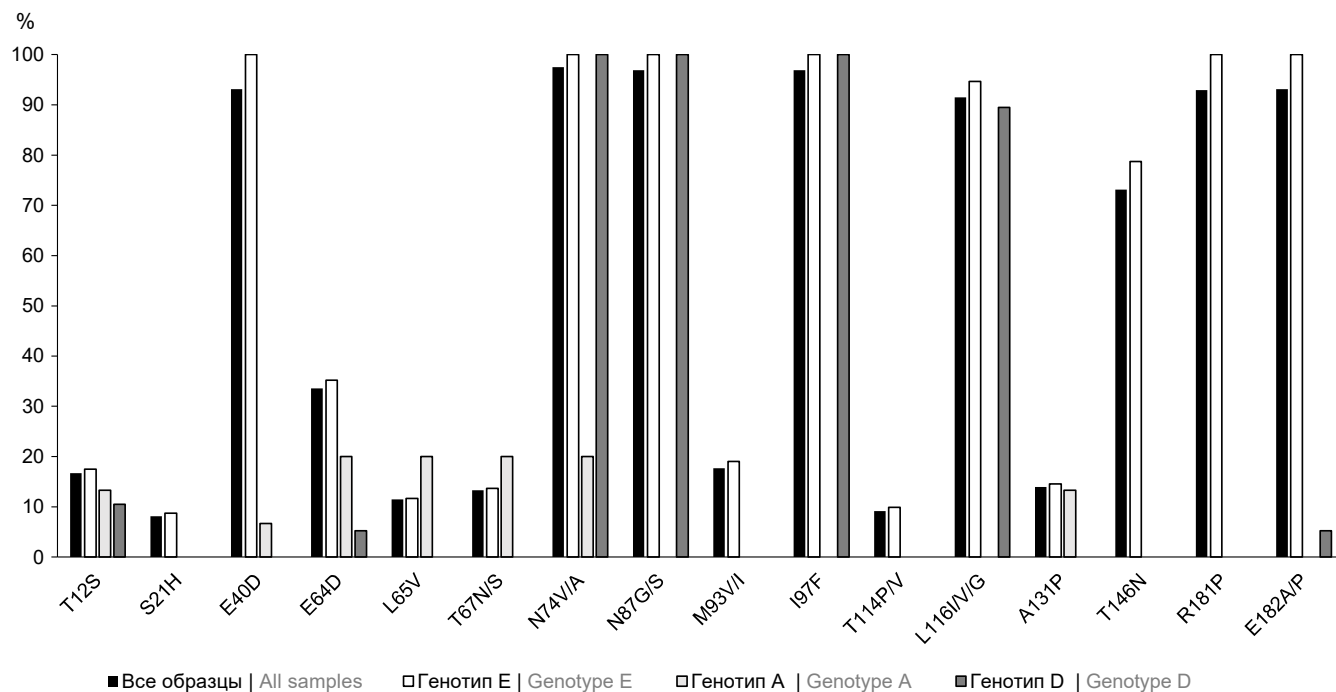


**Рис. 1.** Частота встречаемости аминокислотных замен в preCore-регионе генома ВГВ в обследованной группе и в соответствии с генотипами.

\* — стоп-кодон. Аминокислотные замены представлены относительно консенсусной последовательности вируса Mart-B47 (HE974377.1, генотип D) с дополнительным анализом относительно генотип-специфических референсных последовательностей AY128092.1 (генотип A), NC\_003977.2 (генотип D) и AB032431.1 (генотип E).

**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).



**Рис. 2.** Частота встречаемости наиболее распространённых аминокислотных замен в Core-регионе генома ВГВ в обследованной группе и в соответствии с генотипами.

Аминокислотные замены представлены относительно консенсусной последовательности вируса Mart-B47 (HE974377.1, генотип D) с дополнительным анализом относительно генотип-специфичных референсных последовательностей AY128092.1 (генотип A), NC\_003977.2 (генотип D) и AB032431.1 (генотип E).

**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).

вирусного капсида Core-белок размером 21 кДа. С расположенного выше по цепи AUG-кодона кодируется белок preCore размером 24 кДа. Белок Core играет ключевую роль в жизненном цикле ВГВ, а изменения в его последовательности способны служить потенциальными маркерами прогрессирования заболевания [12]. HBeAg служит основной мишенью для иммунного ответа хозяина, особенно атаки цитотоксических Т-лимфоцитов CD4 и CD8, при которой несинонимичные мутации, изменяющие иммунные эпитопы, могут привести к образованию вариантов ускользания от иммунного ответа, что приводит к персистенции ВГВ. Более того, поскольку замены в Core-регионе могут привести к одновременным заменам в HBeAg, ключевом иммунорегуляторном белке вируса, то и способны оказать значительное влияние на естественное течение ХГВ [28]. Решающую роль в репликации вируса играет также ВСР, способствуя образованию preCore и прегеномной РНК [29], значит, мутации в этой области также могут способствовать развитию заболевания. Ведущие к таким изменениям мутации в разных областях генома вируса могут быть следствием как естественной эволюции вируса, так и внешнего влияния, поскольку и эндогенное, и эк-

зогенное селективное воздействие приводят к модификации структуры генома патогена за счёт его высокой вариабельности, особенно при длительном течении заболевания [24].

В обследованной группе у 15 человек выявлен ВГВ генотипа А, включая 8 случаев генотипа А1, который эндемичен для Африки и прошёл длинный эволюционный путь на континенте. Ранее было показано, что у африканцев, инфицированных субгенотипом А1, риск развития рака печени в 4,5 раза выше, чем у инфицированных другими геновариантами, причём рак развивается в более раннем возрасте [30].

Большую часть изученной в рамках настоящей работы группы составляют пациентки с ВГВ генотипа Е. Этот геновариант является одним из наиболее распространённых в странах Африки к югу от Сахары, в том числе в Гвинейской Республике и её странах-соседях. Несмотря на широкую встречаемость, этот вариант вируса имеет сравнительно низкую относительно других вариабельность генома, что может свидетельствовать о его более коротком эволюционном пути [31]. В то же время некоторые исследователи высказывали опасения по поводу эффективности вакцины против ВГВ при генотипе Е,

**Таблица 2.** Наиболее распространённые клинически значимые мутации, выявленные в BCP и preCore/Core-регионе в обследуемой группе

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

Область генома ВГВ HBV genome region	Мутация Mutation	Частота встречаемости в группе (n = 480) Frequency of occurrence in the group (n = 480)			Генотип Genotype	Клиническая значимость мутации Clinical significance of the mutation	
		n	%	95% ДИ 95% CI			
BCP	<i>A1762T/G1764A</i>	74	15,42	12,30–18,96	E	Прогрессирование заболевания, ЦП и ГЦК [24, 25] Disease progression, liver cirrhosis and HCC [24, 25]	
PreCore	<i>H5D</i>	130	27,08	23,16–31,30	E	HBsAg-негативный ВГВ генотип E связан с тяжёлым заболеванием печени. Может частично объяснить высокую распространённость ГЦК в Африке [26] 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	<i>K21N/Q/R</i>	31	6,46	4,43–9,04	E, D	Предположительно связан с прогрессированием заболевания, особенно у HBsAg-негативных пациентов [26] Presumably associated with disease progression, especially in HBsAg-negative patients [26]	
PreCore	<i>W28* (G1896A)</i>	169	35,21	30,93–39,67	E, A	Прогрессирование заболевания, ЦП и ГЦК [24, 25] Disease progression, liver cirrhosis and HCC [24, 25]	
PreCore	<i>G29D (G1899A)</i>	88	18,33	14,97–22,09	E, D		
Core	<i>E64D</i>	161	33,54	29,33–37,96	E, A, D	Прогрессирование заболевания, ЦП и ГЦК, ускользание от иммунного ответа [24, 25] Disease progression, liver cirrhosis and HCC, immune escape [24, 25]	
Core	<i>E113Q</i>	19	3,96	2,40–6,11	E, A	Ускользание от иммунитета, отбор специфических антител, хроническая персистенция вируса, прогрессирование заболевания, ЦП и ГЦК [24, 25] Immune escape, selection of specific antibodies, chronic persistence of the virus, disease progression, liver cirrhosis and HCC [24, 25]	
Core	<i>T114P/V</i>	44	9,17	6,74–12,11	E		
Core	<i>L116I/V/G</i>	439	91,46	88,59–93,8	E, D		
Core	<i>F122C</i>	11	2,29	1,15–4,06	E		
Core	<i>W125T</i>	13	2,71	1,45–4,59	E		
Core	<i>P130T</i>	29	6,04	4,08–8,56	E, D		
Core	<i>A131P</i>	67	13,96	10,98–17,38	E, A		
Core	<i>R133T</i>	11	2,29	1,15–4,06	E		
Core	<i>S141P</i>	12	2,5	1,30–4,33	E		
Core	<i>L143T</i>	14	2,92	1,60–4,85	E		
Core	<i>T146N</i>	351	73,13	68,92–77,04	E		Усиливают образование ккзДНК ВГВ при внутриклеточной амплификации и ослабляют при инфицировании [27]. Ускользание от иммунитета, отбор специфических антител, хроническая персистенция вируса, прогрессирование заболевания, ЦП и ГЦК [24, 25] 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]

т.к. при таком геноварианте нередко наблюдали прорывные инфекции. Предположительно, это может быть связано с двойной мутацией *A1762T/G1764A* в BCP, ассоциированной не только с прогрессированием заболевания печени, но и со сниженным уровнем секретируемого HBeAg, с ускользанием от иммунного ответа [32]. Таким образом, известная для ВГВ генотипа E высокая заболеваемость ГЦК может быть связана как с распространённостью

изменений генома, ведущих к прогрессированию заболевания, так и с упомянутым ранее поздним обнаружением инфицирования, причём один фактор не исключает другой [31]. В обследованной нами группе была показана высокая встречаемость двойной мутации *A1762T/G1764A* (15,42%). Кроме того, обнаружено значительное количество мутаций в preCore/Core-регионе ВГВ, в том числе показана высокая частота мутации preCore *G1896A* (35,21%),

приводящая к появлению стоп-кодона (W28\*), преждевременному обрыву предшественника HBeAg, отвечающей более чем за 90% случаев дефектной секреции HBeAg и, соответственно, отмены экспрессии антигена, что характерно для больных, инфицированных ВГВ генотипа Е [33]. Отметим, что столь же высокая распространённость мутации *G1896A* (47,11%) была показана ранее у жителей Гвинейской Республики с ВГВ генотипа Е [22]. Выявленная в настоящей работе аминокислотная замена preCore-региона ВГВ генотипа Е *H5D* при HBeAg-негативном генотипе Е связана с тяжёлыми заболеваниями печени. Эта мутация также может частично объяснить высокую распространённость ГЦК в Африке. Ещё две значимые для развития ГЦК мутации, связанные с тяжёлым заболеванием у HBeAg-отрицательных лиц, — *K21N/Q/R* и *G29D* в preCore-области, выявлены среди изолятов генотипов Е и D [26]. В обследованной группе обнаружено значительное количество мутаций в Core-регионе в позициях 113–143, влияющих, как известно, на антигенность и стабильность частицы и приводящих к появлению ускользающих от иммунитета мутантов, ведущих к хронической персистенции вируса.

Для большинства выявленных в Core-регионе аминокислотных замен нет достоверных сведений об их клинической значимости, однако известны сайты иммунного распознавания HBeAg, в том числе эпитопы-мишени для CD4<sup>+</sup>-Т-клеток человека (аминокислотные позиции 1–20, 50–69, 81–105, 117–131, 141–165), цитотоксические Т-лимфоциты/CD8<sup>+</sup>-Т-клетки (аминокислотные позиции 18–27, 88–96, 130–140, 141–151), эпитопы В-клеток (аминокислотные позиции 74–89, 107–118, 127–138). Мутации в таких иммуноактивных участках HBeAg имеют жизненно важное значение для персистенции вируса, иммунного ответа хозяина и прогрессирования заболевания [25]. Таким образом, среди обнаруженных аминокислотных замен ряд мутаций имеет потенциальное клиническое значение, способствуя развитию ХГВ, например, локализованные в участках эпитопов Т-клеток (*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*, *S157D*) и В-клеток (*N74V/A*, *P79Q*, *A80T*, *N87G/S*, *L108I*, *E113Q*, *T114P/V*, *L116I/V/G*, *P130T*, *A131P*, *R133T*). Аминокислотные замены в основных иммунных эпитопах потенциально способны нарушить иммунный ответ, что, в свою очередь, может стать одной из причин развития HBeAg-негативного гепатита В, привести к персистирующей инфекции и высокой вариабельности всех регионов генома вируса [34]. Отметим, что среди перечисленных мутаций есть те, которые достоверно связаны с развитием ЦП и ГЦК, в том числе расположенные в эпитопах В-клеток *E77D/Q*, *A80T* и *L116I/V/G*, а также в эпитопах Т-клеток —

*E64D* и *T91N/S*. Учитывая высокую встречаемость таких замен, нельзя исключать их значительную роль в повышенной распространённости тяжёлых заболеваний печени в странах Африки, особенно в случаях ВГВ генотипа Е. Особое внимание привлекают аминокислотные замены, выявленные абсолютно у всех обследованных лиц генотипа Е — *E40D*, *N74V/A*, *N87G/S*, *I97F*, *R181P*, *E182A/P*, которые, учитывая их 100% представленность, могут быть характерны для генотипа Е в целом или связаны с особенностями этого геноварианта вируса в Гвинейской Республике, но, с другой стороны, связаны с прогрессированием заболевания печени.

В рамках исследования показана большая вариабельность preCore/Core-региона генотипа Е по сравнению с А и D, в то время как известно, что в целом для ВГВ генотипа Е характерна относительная гетерогенность в сравнении с другими генотипами. По всей видимости, полученные нами противоречащие этому факту результаты связаны с тем, что в группе преобладали изоляты генотипа Е, в то время как генотипы А и D представлены единичными случаями.

За последние 15 лет встречаемость мутаций среди изолятов ВГВ генотипа Е значительно возросла. В 2009 г. Р. Garmigi и соавт. продемонстрировали, что в Гвинейской Республике 26,0% случаев ВГВ генотипа Е имели 1 или более мутаций в положениях 1762, 1764 и/или 1896, преждевременный стоп-кодон, связанный с мутацией *G1896A*, наблюдался в 20,8% последовательностей, а 5,2% имели тройную мутацию [35]. В нашем исследовании *G1896A* представлена в 1,5 раза чаще (35,21%), а тройная мутация показана у 47 человек — 9,79% (95% ДИ 7,28–12,81%) от общей группы и 10,54% (95% ДИ 7,85–13,77%) от лиц с генотипом Е. Вероятнее всего, такие мутации представляют собой следствие естественного полиморфизма вируса. Однако мутации в позициях 1762, 1764, 1896 относятся к самым распространённым. В Пакистане *A1762T/G1764A* отмечена в 30% случаев, *G1896A* — в 38% [36]. В Эфиопии частота *A1762T/G1764A* составила 25,9% случаев, *G1896A* — 25,2% [37]. В Бразилии встречаемость *A1762T/G1764A* составила 59,3% случаев, *G1896A* — 84,1% [38]. Кроме того, встречаемость указанных мутаций нередко связана с генотипом вируса. Так, встречаемость *A1762T/G1764A* во Вьетнаме составила 93,3% при генотипе С и 50% при генотипе В, а *G1896A* — 74,2% при генотипе В и 2,2% при генотипе С [39]. Анализ 6479 последовательностей ВГВ разных генотипов из международной базы данных позволил определить общую частоту *A1762T/G1764A* — 28,9%, представленность этой двойной мутации относительно генотипов была следующей: А — 26,9%; В — 15,5%; С — 46,1%; D — 21,5%; Е — 11%; F — 22,5%; G — 97,5%; H — 3,8%, однако следует отметить, что объём

ём выборки генотипов E–H оказался в разы меньше, чем остальных генотипов [40]. По всей видимости, именно с этим была связана сравнительно низкая встречаемость *A1762T/G1764A* при генотипе E, в то время как, например, в Нигерии, где обследованная группа была представлена преимущественно генотипом E, *A1762T/G1764A* выявлена в 43% случаев, *G1896A* — в 57% [41].

Следует отметить, что в нашей когорте HBsAg-негативные образцы и образцы с низкой вирусной нагрузкой были более вариабельны на протяжении preCore/Core-региона, что может быть связано в том числе с ингибированием репликации ВГВ мутациями preCore/Core-региона. В многочисленных исследованиях описана связь между частотой мутаций в preCore/Core-регионе и прогрессированием заболевания печени у пациентов, инфицированных ВГВ, однако ассоциация между аминокислотными заменами и клинической тяжестью заболевания существенно различается как в разных популяциях, так и в разных исследованиях одних и тех же популяций. Это очевидное несоответствие можно объяснить различными факторами, включая генотип вируса, этническую принадлежность пациента, иммунную компетентность хозяина и коинфекцию другими вирусами. Тем не менее ряд мутаций, для которых показана достоверная связь с ЦП и ГЦК, а также влияющие на серологический статус HBeAg, могут служить диагностическими и прогностическими маркерами для раннего выявления прогрессирования заболевания печени у инфицированных ВГВ лиц.

### Заключение

Распространённость у терапевтически наименее беременных женщин Гвинейской Республики клинически значимых аминокислотных замен preCore/Core-региона ВГВ отражает их встречаемость в популяции и косвенно объясняет причины крайне высокой частоты ГЦК в африканских странах. Ряд таких аминокислотных замен, ассоциированных, как показано для генотипов D и A, с прогрессированием заболевания, характерны для генотипа E. Определение генотипов и мутаций генома вируса может быть использовано для прогноза прогрессирования заболевания. Выявленная изменчивость свидетельствует о необходимости исследования особенностей патогена и иммунного ответа хозяина, в том числе при HBsAg-негативном ВГВ. Полученные нами результаты свидетельствуют о необходимости уделить особое внимание нарастающему эпидемическому кризису ВГВ в странах Африки к югу от Сахары. Этот регион находится в самом конце списка по доступности целого ряда медицинских услуг, включая скрининг, диагностику и лечение людей, инфицированных этим вирусом. Результаты исследования могут служить исходными

данными для оценки национальной заболеваемости ВГВ и планирования массовой иммунизации против ВГВ в Гвинейской Республике.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. 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)
2. Kean E., Funk A.L., 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>
3. 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>
4. 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>
5. 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>
6. 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>
7. 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>
8. 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>
9. 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>
10. 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>
11. 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>
12. Yil 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>
13. Mixson-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>
14. 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>
15. 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>
16. Бумбали С., Серикова Е.Н., Семенов А.В. и др. Значимость лабораторной диагностики парентеральных вирусных гепатитов в Гвинейской Республике. *Журнал микробиоло-*

- ши, эпидемиологии и иммунологии. 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>
17. 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>
  18. 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>
  19. 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>
  20. 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>
  21. Попова А.Ю., Кутырев В.В., Тотолян А.А., ред. *Гепатит В в странах Западной Африки: эпидемиология, диагностика, профилактика*. СПб.; 2021. Попов А.Ю., Кутырев В.В., Тотолян А.А., ed. *Hepatitis B in West African Countries: Epidemiology, Diagnosis, Prevention*. St. Petersburg; 2021. EDN: <https://elibrary.ru/lprjvtd>
  22. 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. Boubaly 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 mono-infection 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>
  23. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Тотолян 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>
  24. 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., Maffionelli 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>

#### Информация об авторах

**Останкова Юлия Владимировна**<sup>✉</sup> — 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](mailto:shenna1@yandex.ru); <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

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

**Бумбали Санаба** — к.б.н., зав. аспирантурой НИИ прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика, директор Международного центра исследований тропических инфекций в Гвинеи, Нзерекаре, Гвинейская 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>

**Тотолян 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; *Тотолян 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

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**<sup>✉</sup> — 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](mailto: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. Schemelev** — 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.*, *Reingardt D.E.*, *Schemelev 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



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



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

Макарова М.А.<sup>1,2✉</sup>, Матвеева З.Н.<sup>1</sup>, Кафтырева Л.А.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Северо-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, мочевого пузыря), 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>

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

Mariia A. Makarova<sup>1,2</sup>, Zoya N. Matveeva<sup>1</sup>, Lidiya A. Kaftyreva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>North-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/ytqqs>

## Введение

Мочевыводящие пути являются распространённым локусом бактериальной инфекции, а *Escherichia coli* — наиболее частым возбудителем этого биотопа. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) могут иметь различную клиническую картину — от бессимптомной бактериурии, восходящих инфекций (острого пиелонефрита) до тяжёлого уросепсиса [1–3].

Уропатогенные/Uropathogenic *E. coli* (UPEC) характеризуются повышенной адаптационной спо-

собностью к выживанию и размножению в мочевом тракте за счёт наличия специфических липополисахаридов, капсул, белков наружной мембраны, фимбрий, пилей, секретируемых токсинов, сидерофоров, а также резистентности к бактерицидному действию сыворотки. Уропатогенный потенциал *E. coli* последовательно реализуется на различных этапах инфекционного процесса: адгезии, колонизации, персистенции [4].

Для успешной колонизации тканей мочевыводящей системы *E. coli* необходимы конкретные ад-

гезины. К основным факторам адгезии относят пили или фимбрии. Типичными для UPEC являются пили 1-го типа (FimH), P, S и F1C-фимбрии. Адгезины FimH, кодируемые геном *fimH*, играют важную роль в начале развития ИМП и считаются самым распространённым фактором вирулентности UPEC [5, 6]. Штаммы, вызывающие цистит, всегда экспрессируют фимбрии типа 1; при отсутствии других фимбрий инфекция ограничивается поражением мочевого пузыря. Главной разновидностью пилей, специфичных для UPEC, являются P-фимбрии, кодируемые геном *pap*. Они отсутствуют у комменсальных и диареогенных *E. coli* и получили такое название, т.к. чаще обнаруживаются у штаммов, ассоциированных с пиелонефритом [7]. Маннозрезистентные S-пили подразделяют на Sfa-, F1C-пили (Foc) и S/F1C-связанные пили (Sfr). Эти адгезины имеют высокую степень гомологии, но различаются рецепторной специфичностью; S-пили экспрессируются преимущественно штаммами сепсис- (SEPEC) и менингит-ассоциированными *E. coli* (NMEC), но могут встречаться и у штаммов UPEC, вызывающих восходящие ИМП. Кроме фимбриальных адгезинов, у UPEC широко распространены афимбриальные, кодируемые геном *afa*, способствующие адгезии к уротелиальным клеткам. Штаммы, синтезирующие афимбриальные адгезины, имеют высокий потенциал развития пиелонефрита и рецидивирующего цистита [8].

Токсины играют важную роль при ИМП, поскольку способствуют распространению бактерий в тканях, повышению цитотоксичности, устойчивости к нейтрофилам, повреждению и нарушению метаболизма клеток хозяина. Наиболее изученным токсином, секретлируемым UPEC, является  $\alpha$ -гемолизин — HlyA (продукт гена *hlyA*), который не только стимулирует апоптоз клеток-мишеней, включая нейтрофилы, Т-лимфоциты и почечные эпителиоциты, но и вызывает деградацию регуляторных и структурных компонентов цитоскелета, способствуя отшелушиванию клеток мочевого пузыря и разрушению фагоцитов. Токсин CNF1 (цитотоксический некротический фактор 1), кодируемый геном *cnf*, препятствует полиморфноядерному фагоцитозу, способствует выработке биологически активных компонентов, вызывая функциональные и структурные повреждения, а также апоптоз эпителиальных клеток мочевого пузыря [6, 8]. Токсин с ДНКазной активностью CDT (фактор расширения цитолетального токсина), кодируемый геном *cdt*, приводит к апоптозу клеток; встречается более чем у 90% штаммов UPEC [9, 10].

К факторам персистенции UPEC относят капсулы (синтез К-антигенов), которые защищают бактерии от фагоцитоза и бактерицидного действия системы комплемента [8].

Решающее значение для выживания UPEC в уретральном тракте имеет продукция сидерофоров

(железосвязывающих белков), определяющих способность бактериальных клеток к захвату железа. Синтез сидерофоров увеличивает вирулентность UPEC. К основным сидерофорам относят аэробактин (*iutA*) и иерсинибактин (*fyuA*) [11].

В рутинной практике бактериологического исследования методы типирования *E. coli*, вызывающих ИМП, не используют. Критерием диагноза при ИМП является обнаружение микроорганизмов в концентрации как минимум  $10^3$  КОЕ в 1 мл мочи. Выявление диагностически значимой бактериурии не дает представления о локализации инфицирования мочевой системы (почечная паренхима, мочевого пузыря) [1]. Поэтому одной из наиболее важных задач лаборатории клинической микробиологии является осмысленный анализ полученных результатов, а также оценка этиологической значимости выделенного микроорганизма [12]. Основную сложность при интерпретации результатов представляют изоляты, выделенные из мочи, за счёт возможной контаминации *E. coli* представителями нормобиоты кишечника. Врач-микробиолог должен не только определить, является ли выделенный изолят *E. coli* истинным возбудителем или это следствие контаминации пробы на преаналитическом этапе, но и оценить патогенный потенциал конкретного изолята в развитии хронических форм ИМП или тяжёлых жизнеугрожающих состояний, таких как сепсис или менингит. Несмотря на то что научные исследования продолжаются в течение многих лет, конкретные критерии для отнесения штаммов к UPEC не установлены.

В результате вышесказанного **цель работы** — охарактеризовать популяционную структуру, генетическое разнообразие и патогенный потенциал штаммов *E. coli*, выделенных из мочи.

## Материалы и методы

Объектами исследования явились 194 штамма *E. coli*, выделенные из мочи пациентов с неосложнёнными ИМП. Предметом исследования служили биологические свойства штаммов, отражающие патогенность (гены вирулентности, ассоциированные с адгезией, инвазией, токсинообразованием, персистенцией и др.).

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).

Выделение ДНК проводили с использованием набора «InstaGene Matrix» («BioRad»). ПЦР выполняли в режиме автоматической амплификации в термоциклере «СХТ-1000» («BioRad»). Использовали готовую смесь с Taq ДНК-полимеразой, «PCR Master Mix» («ThermoFisher Scientific»). Праймеры

вносили в пределах 0,5–1,5 мкл при неизменённом объёме пробы (20 мкл), что достигалось соответствующим изменением объёма стерильной дистиллированной воды. Использовали ранее исследованные праймеры («Синтол», «Сибэнзим», «Евроген») [13–15]. Разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 0,5×ТВЕ буфере с добавлением бромистого этидия при 120 В в течение 60 мин в камере для электрофореза («BioRad») в горизонтальном геле. Для визуализации результатов ПЦР использовали систему документирования «GelDoc» («BioRad»). В качестве маркеров молекулярного веса применяли ДНК-маркер «100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb» («Сибэнзим»).

Штаммы тестировали на наличие 17 генов, кодирующих синтез факторов вирулентности: адгезинов (*pap*, *fimH*, *sfa*, *focG* и *afa*), токсинов (*hlyA*, *cvaC*, *cnf* и *cdtB*), капсульных антигенов (*kpsMTII*, *kpsMTIII*, *kpsMT K1*), сидерофоров (*fyuA* и *iutA*), инвазинов (*ibeA*), а также на присутствие генетических маркеров острова патогенности (PAI) UPEC CFT073 и гена (*traT*), кодирующего фактор резистентности к бактерицидному действию сыворотки.

Филогенетическую принадлежность штаммов *E. coli* определяли методом мультиплексного флотипирования на основе ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на три маркера: *chuA*, *yjaA* и TspE4.C2 [16].

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы «Excel» («Microsoft»). Для оценки статистической значимости различий средних величин применяли точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при доверительном интервале 95% ( $p < 0,05$ ).

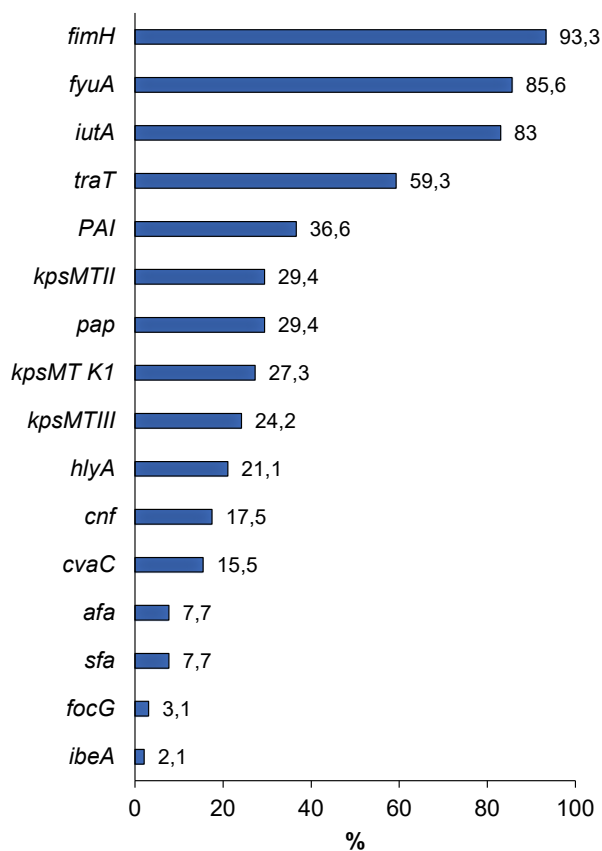
## Результаты

При анализе комбинации генов *chuA*, *yjaA* и TspE4.C2 установлено, что штаммы *E. coli* статистически значимо чаще ( $p < 0,05$ ) принадлежали филогенетической группе B2 (57,7%) по сравнению со штаммами филогрупп А (4,6%), В1 (7,2%) и D (30,4%); значимо реже ( $p < 0,05$ ) — к филогруппам А и В1 по сравнению с В2 и D.

Распространённость генов, кодирующих синтез факторов вирулентности UPEC, колебалась от 2,1% (*ibeA*) до 93,3% (*fimH*). Ген, ответственный за продукцию цитолетального расширяющего токсина (*cdtB*), участвующего в подавлении пролиферации клеток с последующей их гибелью, ни у одного штамма не выявлен. Частота встречаемости генетических детерминант, кодирующих факторы вирулентности UPEC, представлена на рисунке.

Анализ детекции генов, ассоциированных с адгезией, показал, что практически все штаммы содержали ген *fimH* (93,3%), кодирующий маннозочувствительные фимбрии 1-го типа. Ген *pap*, ответственный за синтез пиелонефрит-ассоциированных

пилей, встречался практически у каждого третьего штамма (29,4%); ген *afa*, кодирующий афимбриальные адгезины, — у 7,7% изученных штаммов *E. coli*; детерминанты *sfa* и *focG*, ассоциированные с фимбриальными адгезинами, — у 7,7 и 3,1%; гены *hlyA* и *cnf*, кодирующие синтез токсинов ( $\alpha$ -гемолизина и цитонекротического фактора), — у 21,1 и 17,5%; ген *cvaC*, ответственный за продукцию колицина V, — у 15,5%. Ответственный за инвазию эндотелиальных клеток гематоэнцефалического барьера ген *ibeA* обнаружен у 4 (2,1%) штаммов *E. coli*. Частота встречаемости генетических детерминант, кодирующих синтез сидерофоров: иерси небактина (*fyuA*) и азробактина (*iutA*), составляла 85,6 и 83,0%. Гены, кодирующие синтез капсульных антигенов, выявлены у 61,9% изученных штаммов. Гены *kpsMTII* и *kpsMTIII*, кодирующие комплексы антигенов K1, K5, K12 и K3, K10, K54, были выявлены у 29,4 и 24,2% штаммов. «Типоспецифический» ген *kpsMT K1*, кодирующий антиген K1, по химической структуре и иммунохимическим характеристикам идентичный K-антигену *Neisseria meningitidis*, обнаружен у 27,3% штаммов. Кодирующий фактор устойчивости бактериальной клетки к бактерицидному действию сыворотки крови — ген *traT* — выявлен у 59,3% штаммов. У 36,6% штаммов были выявлены PAI — UPEC CFT073.



Распространённость генов, кодирующих факторы вирулентности UPEC.

Prevalence of genes encoding UPEC virulence factors.

Генетические детерминанты вирулентности УРЕС в изученных штаммах присутствовали в сочетаниях и изолированно. В геноме 4 (2,1%) штаммов не выявлено ни одного из тестируемых генов вирулентности. У 1 (0,5%; 95% ДИ 0,1–2,9%) штамма был выявлен 1 ген. Остальные 99,5% штаммов характеризовались наличием комбинаций генов, из них 1,5% (95% ДИ 0,5–4,5%) — сочетанием 2 генетических детерминант, 10,3% (95% ДИ 6,8–15,4) — 3. Статистически значимо чаще ( $p < 0,05$ ) встречались штаммы, содержащие комбинации из 4 генов, — 16,0% (95% ДИ 11,5–21,8%), 5 генов — 23,2% (95% ДИ 17,8–29,6%), 6 генов — 33,0% (95% ДИ 26,8–39,9%). Семь маркеров вирулентности были выявлены у 9,8% (95% ДИ 6,4–14,8%) штаммов, 8 — у 3,1% (95% ДИ 1,4–6,6%), 9 — у 2,1% (95% ДИ 0,8–5,2%). Геном 1 штамма (0,5%; 95% ДИ 0,1–2,9%) был представлен индивидуальным профилем и характеризовался комбинацией 10 генов.

Встречаемость генов и кодируемые ими факторы вирулентности *E. coli* различных филогенетиче-

ских групп представлены в **таблице**. В штаммах всех филогенетических групп значимо чаще ( $p < 0,05$ ), по сравнению с другими генами, ассоциированными с адгезией, присутствовал ген *fimH*. Ген *pap* встречался в штаммах *E. coli* филогенетической группы В2 (36,6%), что значимо чаще ( $p < 0,05$ ) по сравнению со штаммами групп А (11,1%), В1 (14,3%) и D (1,7%). Кодирующий афимбриальные антиген-связывающие адгезины ген *afa* чаще присутствовал в штаммах филогенетической группы В1 (64,3%). Кодирующий синтез фимбриальных адгезинов ген *sfa* без значимых различий был выявлен в штаммах филогенетических групп В1 (4,8%) и В2 (11,8%). Ген *focG*, кодирующий фимбриальный адгезин F1C уропатогенных *E. coli*, выявлен только в штаммах филогенетической группы В2 (4,5%).

Анализ встречаемости генов, ассоциированных с продукцией токсинов, показал, что статистически значимо чаще ( $p < 0,05$ ) генетические маркеры токсинообразования присутствовали в штаммах филогенетической группы В2 (46,4%) по сравнению со штаммами других филогрупп.

#### Встречаемость генов и факторов вирулентности в штаммах *E. coli* различных филогенетических групп

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

Гены и факторы вирулентности Genes and virulence factors	Филогенетические группы   Phylogenetic groups											
	A (n = 9)			B1 (n = 14)			B2 (n = 112)			D (n = 59)		
	абс. abs.	%	95% ДИ 95% CI	абс. abs.	%	95% ДИ 95% CI	абс. abs.	%	95% ДИ 95% CI	абс. abs.	%	95% ДИ 95% CI
<b>Адгезины   Adhesins</b>	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
<b>Токсины   Toxins</b>	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
<b>Инвазины   Invasins</b>	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
<b>Сидерофоры   Siderophore</b>	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
<b>Капсулы   Capsules</b>	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
<b>Другие   Others</b>												
<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

Генетические маркеры, ответственные за синтез сидерофоров, без достоверных различий присутствовали в штаммах, принадлежащих к различным филогенетическим группам.

Гены, кодирующие синтез К-антигенов (*kpsMTIII*, *kpsMT K1*, *kpsMTII*), защищающих бактериальную клетку от фагоцитоза, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) чаще присутствовали в штаммах филогенетической группы В2 (56,3%) по сравнению со штаммами других филогенетических групп.

Ген *traT* — фактор резистентности к бактерицидному действию сыворотки крови и PAI — маркер острого патогенности UPEC в сопоставимых долях встречались в штаммах всех филогенетических групп.

### Обсуждение

Основную сложность интерпретации результатов культурального метода при детекции патогенных штаммов — возбудителей заболеваний внекишечной локализации (ExPEC) представляют изоляты, выделенные из мочи, в связи с отсутствием чётко сформулированных критериев оценки этиологической значимости конкретного изолята, а также из-за возможной контаминации пробы. К истинным возбудителям ExPEC, включая UPEC, относят штаммы, содержащие 2 или более основных генов вирулентности (*pap*, *sfa*, *afa*, *kpsMTII*, *iutA*). Другие, так называемые дополнительные гены (*fimH*, *hlyA*, *cvaC*, *cnf*, *cdtB*, *kpsMTIII*, *ibeA*, *traT* и *PAI*), могут быть потенциально связаны с ExPEC, т.к. способствуют адаптивной и конкурентной колонизации [17, 18]. Штаммы *E. coli*, которые, помимо основных генов вирулентности ExPEC, имеют и потенциальные, характеризуются повышенной способностью адаптироваться к новым нишам, что позволяет им вызывать широкий спектр заболеваний.

Выделенные из мочи штаммы *E. coli* принадлежали к различным филогенетическим группам, причём большинством (88,1%) — к группам В2 (57,7%) и D (30,4%), к которым, как правило, относят возбудителей заболеваний внекишечной локализации [19]. К группам А и В1, с которыми ассоциируют комменсальные *E. coli*, были отнесены 4,6 и 7,2% штаммов [16]. Патогенетически значимые генетические детерминанты вирулентности выявлены у 97,9% штаммов. По сочетанию 17 генов, ассоциированных с адгезией (*fimH*, *pap*, *afa*, *sfa* и *focG*), синтезом сидерофоров (*fyuA* и *iutA*), капсул (*kpsMTII*, *kpsMTIII* и *kpsMT K1*), токсинов (*hlyA*, *cnf*, *cdt* и *cvaC*), инвазинов (*ibeA*), обеспечивающих резистентность к бактерицидному действию сыворотки крови (*traT*), наличию острова патогенности UPEC (*PAI*) выявлены 134 индивидуальных генотипа вирулентности. Подавляющее большинство (99,5%) штаммов содержали от 2 до 10 генов вирулентности. Полученные результаты, свидетельствующие о

выраженной генетической гетерогенности штаммов UPEC, согласуются с данными российских исследователей [20, 21]. Проведённое исследование показало, что 95,9% (186/194) штаммов, выделенных из мочи, удовлетворяли критериям UPEC — имели 3–10 генов, принадлежали к филогруппам В2 и D. Восемь (4,1%) штаммов принадлежали к филогруппам А и В1, не имели основных и дополнительных генов вирулентности и были расценены как контаминанты.

Генетическая предрасположенность к рецидивам ИМП была у выявлена 93,3% штаммов за счёт наличия адгезинов *FimH*, кодируемых геном *fimH*, содействующих персистенции UPEC [5–7]. Кроме фимбриальных адгезинов, у UPEC широко распространены кодируемые геном *afa* афимбриальные адгезины семейства Afa/Dr, способствующие адгезии с уротелиальными клетками. В проведённом исследовании у 13 обследованных пациентов были выявлены штаммы, синтезирующие афимбриальные адгезины, которые, согласно данным других исследователей, имеют высокий потенциал возникновения пиелонефрита и рецидивирующего цистита [22].

Распространённой причиной бактериальных менингитов новорождённых с летальностью до 40%, а также тяжёлых неврологических последствий являются менингит-ассоциированные *E. coli* (NMEC) [23, 24]. В большинстве случаев инфицирование новорождённых происходит при наличии NMEC в мочеполовых путях рожениц, носительстве их в кишечнике или как осложнение неонатального сепсиса [25]. Эшерихиозный сепсис нередко рассматривают как вторичную инфекцию. Каждый третий случай — это уросепсис, который может возникнуть при любом урологическом заболевании (нарушение уродинамики при ИМП, гнойные формы пиелонефрита, задержка мочи, острый простатит) [26]. Риск развития сепсиса повышается при инфекционном процессе, вызванном штаммами *E. coli*, которые имеют в своей структуре Р-пили и S-фимбрии, продуцирующие гемолизин, цитонекротический фактор и синтезирующие капсульный антиген K2 [8, 14]. Маркеры неблагоприятного прогноза течения ИМП выявлены у 12% штаммов, из них 10,7% имели генетические детерминанты, ассоциированные с развитием сепсиса (уросепсиса), 1,3% — менингита.

Наличие достаточно противоречивых результатов при применении традиционного бактериологического метода лабораторного исследования заставляет критически переоценить его диагностическую значимость в сторону, бесспорно, перспективного молекулярно-генетического метода. Общепринятая практика безоговорочного признания этиологической значимости конкретного изолята, количественно преобладающего в пробе при культуральном исследовании, выглядит, по меньшей мере, сомнительной [27]. Тем не менее отказаться от общепринятого

метода культивирования микроорганизмов невозможно в силу того, что он позволяет получить информацию о клинически значимых штаммах, их количестве и ассоциациях, оценить чувствительность к антибиотикам, бактериофагам и дезинфектантам, а также является неотъемлемым этапом выделения ДНК для последующих молекулярных исследований, включая полногеномное секвенирование.

### Заключение

Проведённое исследование показало, что детекция комплекса генов в штаммах *E. coli*, выделенных из мочи, не только подтверждает этиологическую значимость изолята, но и позволяет оценить патогенный потенциал развития хронических форм и острых угрожающих жизни осложнений. Выявленная гетерогенность популяции УРЕС свидетельствует о необходимости оптимизации алгоритма и разработки стандартов лабораторной диагностики и профилактики осложнений заболеваний, вызванных уропатогенными *E. coli*. Результаты интегративного подхода в лабораторной диагностике ИМП с использованием всех адекватных методов (традиционных, современных, инновационных), сосредоточенных на принципах доказательной медицины — достоверности научных доказательств их эффективности, необходимо учитывать в практике специалистов различного профиля.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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/wjcfv>
- Ali I., Rfaque 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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](https://doi.org/10.4103/JNSM.JNSM_31_19)
- 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>
- Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmieciak A., et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog*. 2019;11:10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Meza-Segura M., Zaidi M.B., Maldonado-Puga S., et al. Cytotoxic 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>
- Starčić Erjavec M., Žgur-Bertok D. Virulence potential for extraintestinal 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Johnson J.R., Russo T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2018;8(1). DOI: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0004-2017>
- Russo T.A., Johnson J.R. Medical and economic impact of extraintestinal 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)
- 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/wkgvtv>
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>

#### Информация об авторах

**Макарова Мария Александровна**<sup>✉</sup> — 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](mailto: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

#### Information about the authors

**Mariia A. Makarova**<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), senior researcher, Head, Laboratory of enteric infection, Saint-Petersburg 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](mailto:makmaria@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

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

**Lidiya A. Kaftyreva** — D. Sci. (Med.), senior researcher, Head, Microbiology department, Saint-Petersburg 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



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



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

Мионов К.О.<sup>✉</sup>, 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 сиквенс-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 сиквенс-типы могут быть классифицированы на 4 группы. Первым двум соответствуют клональные комплексы, две другие образованы однократно выявленными сиквенс-типами. Первый клональный комплекс (I) объединяет 11 сиквенс-типов (80 или 88% охарактеризованных *B. miyamotoi*), второй (II) — 2 сиквенс-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, сиквенс-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. Пар, 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 НИОКР 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, бартоцеллез)» (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:** 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. *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>

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<sup>✉</sup>, 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. Sarksyian, 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 ixodid 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>

## Введение

*Borrelia miyamotoi* — возбудитель безэри-темной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ), принадлежащий к группе возбудителей возвратных лихорадок, но передающийся клещами рода *Ixodes*. История открытия, таксономия, биологические свойства возбудителей, аспекты патогенеза, клиники и эпидемиологии ИКБ-БМ опубликованы в монографии А.Е. Платонова в 2017 г. [1]. Актуальным направлением исследований *B. miyamotoi* является разработка способов внутривидовой классификации возбудителей. Это обусловлено как необходимостью изучения клинических особенностей ИКБ-БМ, вызванных различными генетическими вариантами возбудителя, в том числе связанными с феноменом «иммунного избегания» [1], так и необходимостью решения классических эпидемиологических задач, направленных на мониторинг возбудителей. В связи с сильно ограниченным использованием массового параллельного секвенирования, которое связано в первую очередь со сложностью культивирования *B. miyamotoi*, а также с низкой концентрацией возбудителей в образцах биологического материала, возникает необходимость в разработке доступных, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и фрагментном секвенировании методик антигенной и генетической характеристики возбудителей ИКБ-БМ.

Для характеристики антигенного разнообразия *B. miyamotoi* нами предложена методика определения основных поверхностных белков [2, 3], которая позволяет проводить одновременную детекцию нескольких антигенных вариантов и определять наиболее клинически и эпидемиологически значимые варианты возбудителей ИКБ-БМ, циркулирующие на территории России. В то же время определение антигенов не может быть использовано для изучения эволюционных процессов, происходящих в бактериальной популяции, для выявления возбудителей с повышенными вирулентными или патогенными свойствами.

Предложенная ранее отечественными исследователями трёхлокусная схема типирования на основании секвенирования фрагментов генов *rbb*, *glpQ* и *16S* [4] может быть использована для характеристики представителей рода *Borrelia*, однако данная схема не обладает необходимой дискриминирующей способностью для *B. miyamotoi*.

Удобным инструментом изучения генетических свойств возбудителей, не находящихся под давлением иммунной системы, позволяющим идентифицировать отдельные штаммы и проводить характеристику их генетических взаимоотношений, является метод мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ), успешно применяющийся в эпидемиологической практике с 1998 г. [5, 6]. Помимо неоднократно продемонстрированных ранее

преимуществ использования нескольких генетических локусов в анализе генетических взаимоотношений патогенов, важным преимуществом МЛСТ является абсолютная межлабораторная воспроизводимость результатов, что позволяет объединять генетическую и эпидемиологическую информацию в единой базе данных [7]. В настоящее время Интернет-ресурс PubMLST содержит информацию о схемах МЛСТ для более чем 130 видов микроорганизмов; для многих видов опубликованные схемы МЛСТ являются «золотым стандартом» их внутривидовой характеристики. В то же время разработанная схема МЛСТ для бактерий рода *Borrelia* и её модификации<sup>1</sup> не обладают достаточной дискриминирующей способностью, необходимой для дифференциации *B. miyamotoi*. Это связано с тем, что схема МЛСТ изначально была разработана для *B. burgdorferi* [8], что не позволяет использовать её для мониторинга российских возбудителей ИКБ-БМ. Поскольку геном *B. miyamotoi* имеет значительные отличия от бактерий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, возникает необходимость в проведении дополнительного анализа имеющихся полногеномных последовательностей с целью создания и апробации методики МЛСТ *B. miyamotoi*.

## Материалы и методы

### Нуклеотидные последовательности

При выборе последовательностей для проведения МЛСТ использовали полногеномные последовательности 6 российских штаммов — Izh-4 (идентификационный номер в GenBank CP024390.2, номер в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» 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] и 4 зарубежных штаммов — FR64b (CP004217.2), HT-31 (CP114703.1), LB-2001 (CP114690.1) и CA17-2241 (CP021872.1) [1, 10, 11], известных на момент начала исследования.

### Штаммы и образцы биологического материала

При разработке схему МЛСТ апробировали на 7 штаммах: 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) и 81 образцах ДНК *B. miyamotoi*, выделенных в 2012–2022 гг. из 50 клещевых суспензий и крови 31 больного ИКБ-БМ. Клещевые суспензии получили из клещей-переносчиков рода *Ixodes*, собранных в странах Западной Европы и европейских регионах Рос-

<sup>1</sup> URL: <https://pubmlst.org/organisms/borrelia-spp>

сии (*I. ricinus*), а также центральных и восточных регионах России (*I. persulcatus*). Большую часть биологических образцов получили и охарактеризовали при разработке методики для определения антигенных свойств основных поверхностных белков *B. miyamotoi* [2]. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим ко-

митетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 83 от 26.06.2018).

Дополнительно провели исследование 9 штаммов, полногеномные последовательности которых были использованы для выбора МЛСТ-локусов. Характеристика 10 референсных штаммов и 81 образца биологического материала приведена в **табл. 1**.

**Таблица 1.** Источники ДНК *B. miyamotoi* и их генетическая характеристика (сиквенс-тип и клональный комплекс)  
**Table 1.** The *B. miyamotoi* DNA samples sources and their genetic characteristics (sequence types and clonal complex)

Источник ДНК DNA source	Сиквенс-тип Sequence type	Клональный комплекс Clonal complex	Территория Territory	Годы Years	Количество образцов Number of samples
Кровь больных ИКБ-БМ ( <i>n</i> = 37) Blood of patients with ixodid tick-borne borreliosis caused by <i>B. miyamotoi</i> ( <i>n</i> = 37)	ST-1*	I	Свердловская область   Sverdlovsk Region	2016–2018	19
			Удмуртская Республика   Udmurt Republic	2016	1
	ST-2*	I	Свердловская область   Sverdlovsk Region	2017	2
			Удмуртская Республика   Udmurt Republic	2016	1
	ST-3	I	Удмуртская Республика   Udmurt Republic	2016	1
	ST-4	I	Свердловская область   Sverdlovsk Region	2016	1
	ST-5*	I	Удмуртская Республика   Udmurt Republic	2016	1
	ST-12*	I	Свердловская область   Sverdlovsk Region	2017	1
			Красноярский край   Krasnoyarsk Territory	2017	1
	ST-13	I	Свердловская область   Sverdlovsk region	2017	1
ST-14*	I	Новосибирская область   Novosibirsk Region	2012	1	
		Хабаровский край   Khabarovsk Territory	2012	2	
		Свердловская область   Sverdlovsk Region	2017	2	
		Красноярский край   Krasnoyarsk Territory	2017, 2019	3	
Суспензии клещей рода <i>Ixodes</i> ( <i>n</i> = 54) Suspensions of ticks of <i>Ixodes</i> genus ( <i>n</i> = 54)	ST-1*	I	Новосибирская область   Novosibirsk Region	2014, 2017	4
			Свердловская область   Sverdlovsk Region	2013–2014	3
			Самарская область   Samara Region	2019	1
			Омская область   Omsk Region	2022	5
			Республика Алтай   Altai Republic	2016	1
	ST-2*	I	Самарская область   Samara Region	2019	1
			Омская область   Omsk Region	2022	1
	ST-5*	I	Омская область   Omsk Region	2022	1
	ST-6	I	Япония   Japan	1992	1
	ST-7	I	Япония   Japan	1990	1
	ST-8	–	Коннектикут, США   Connecticut, USA	2001	1
	ST-9	–	Калифорния, США   California, USA	2015	1
	ST-10	II	Нидерланды   Netherlands	2018	1
			Чехия   Czech Republic	2019	6
			Кабардино-Балкарская Республика Kabardino-Balkarian Republic	2021	1
ST-11	II	Кабардино-Балкарская Республика Kabardino-Balkarian Republic	2021	1	
ST-12*	I	Новосибирская область   Novosibirsk Region	2017	4	
		Омская область   Omsk Region	2022	3	
ST-14*	I	Республика Алтай   Altai Republic	2016	6	
		Амурская область   Amur Region	2016	1	
		Новосибирская область   Novosibirsk Region	2017	9	
		Омская область   Omsk Region	2022	1	
ST-15	I	Томская область   Tomsk Region	2014	1	

**Примечание.** \*ST найдены как в образцах от пациентов, так и в клещах.

**Note.** \*Sequence types found both in patient samples and ticks.

### ПЦР и секвенирование

Выделение ДНК, постановку ПЦР проводили с использованием реагентов производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Амплификацию и секвенирование фрагментов генов выполняли с праймерами (табл. 2) по программе: 95°C — 15 мин (1 цикл), 95°C — 10 с, 60°C — 20 с, 72°C — 20 с (40 циклов). Методики постановки ПЦР и секвенирования, проведённого с помощью оборудования и реагентов компании «Applied Biosystems», были аналогичны методикам, использованным ранее [2, 12].

### Анализ данных МЛСТ

Обработку результатов секвенирования с обозначением аллелей и сиквенса-типов (sequence type, ST) проводили в соответствии с требованиями разработчиков метода [5–7]. Анализ ST с использованием алгоритмов BURST и UPGMA, а также построение генетического дерева выполнены с помощью программы «START2 v. 1.0.5» [13].

### Результаты

В соответствии с принципами МЛСТ выбор фрагментов ДНК для обозначения аллелей

(МЛСТ-локусов) был подчинён следующим условиям: фрагменты должны находиться в несцепленных генах, расположенных на хромосоме, и должны быть представлены несколькими аллелями, при этом комбинации аллелей должны обеспечивать возможность проведения внутривидовой классификации возбудителей [5, 6]. Анализ полногеномных последовательностей 6 штаммов позволил выделить несколько десятков групп несцепленных генетических локусов, из которых последовательно были выбраны 8 (табл. 2), позволяющие дифференцировать эпидемиологически не связанные, т.е. выделенные в разное время, на разных территориях и от разных источников штаммы. В табл. 3 представлены предложенные нами обозначения аллелей и аллельные профили, которые определяют ST штаммов и ДНК *B. Miyamotoi* в биологических образцах. Для обозначения аллелей приведены координаты МЛСТ-локусов в полногеномных нуклеотидных последовательностях референсных штаммов, за исключением аллелей *nusB-6* и *lysM-7*, для которых приведены идентификационные номера в базе данных GenBank. Отличия в МЛСТ-локусах представлены однонуклеотидными заменами, за исключением фрагмента *nusB*, для которого выявили 2 ал-

**Таблица 2.** Фрагменты генов для МЛСТ и праймеры для ПЦР и секвенирования

**Table 2.** Fragments of genes for MLST, PCR and sequencing primers

Фрагмент гена Fragment name	Белок Protein*	5'–3' последовательности праймеров 5'-3' primer sequences	Длина ПЦР-продукта, п.о. The length of the PCR products, bp	Длина МЛСТ-локуса**, п.о. The length of the MLST loci, bp
<i>acpS</i>	АЦП-синтаза holo-ACP synthase	gACgAAATCAATAgAgTgATATAATAAAgT CTATTACAAATgCAATAgAgTACTCCCTTTCA	365	192
<i>nusB</i>	Фактор антитерминации транскрипции Transcription antitermination factor NusB	ggATTTAAgACATAAaggCTAgAgTTTTAgCTTTTC gAgCTCTCCATATTTTTTAACAAAgCATCAAg	417	380
<i>motB</i>	Моторный белок Flagellar motor protein MotB	CCTgAATATATgTTgACATATggAgACATggTT CCTgCAAATCCAgATACCTCAAATTTACTC	623	413
<i>dnaX</i>	ДНК-полимераза III DNA polymerase III subunit gamma/tau	CTgCTATTAAGAAgCgTCCCAgAgAT CTgATCAAAAAGAgTATAAgCATCCCTTACAC	653	560
<i>rplP</i>	50S-рибосомальный белок 50S ribosomal protein L16	gTATAgAAAgAAgCAAAGAggAAgACTgTCA CACCTCAAATCTCgCCTTATCACAAATATAg	393	269
<i>cdd</i>	Цитидиндеаминаза Cytidine deaminase	GAAGCTGCAAGAAATAATGCATATTCACCAT GCTGCATAATCCTATTATTTGTAAGATAGC	620	233
<i>lysM</i>	Пептидогликансвязывающий домен LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	gACTTgATCCTggTgCTATTgTTAAAgCTAg CCCgATCTCTAAgCTTAAGAgATCTAATTgC	624	522
<i>miaA</i>	Изопентилпирофосфат-трансфераза tRNA (adenosine(37)-N6)-dimethylallyltransferase MiaA	TCCTACgggTgTAaggTAAAgTgACATT CCTCTTCAAAGCAATCCACAATCAATC	626	555

**Примечание.** \*Приведено обозначение продукта гена из базы данных NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). \*\*Нуклеотидные позиции фрагментов МЛСТ-локусов референсных штаммов указаны в табл. 3.

**Note.** \*The designation of the protein from NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). \*\*The nucleotide positions of MLST loci in the reference strains were presented in the Table 3.

**Таблица 3.** Обозначения аллелей и ST  
**Table 3.** Designations of alleles and sequence types

Источник ДНК DNA source	Фрагменты (длина, п.о.)***   Fragments (length, bp)***								ST 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)		
Штаммы** 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
Образцы ДНК 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

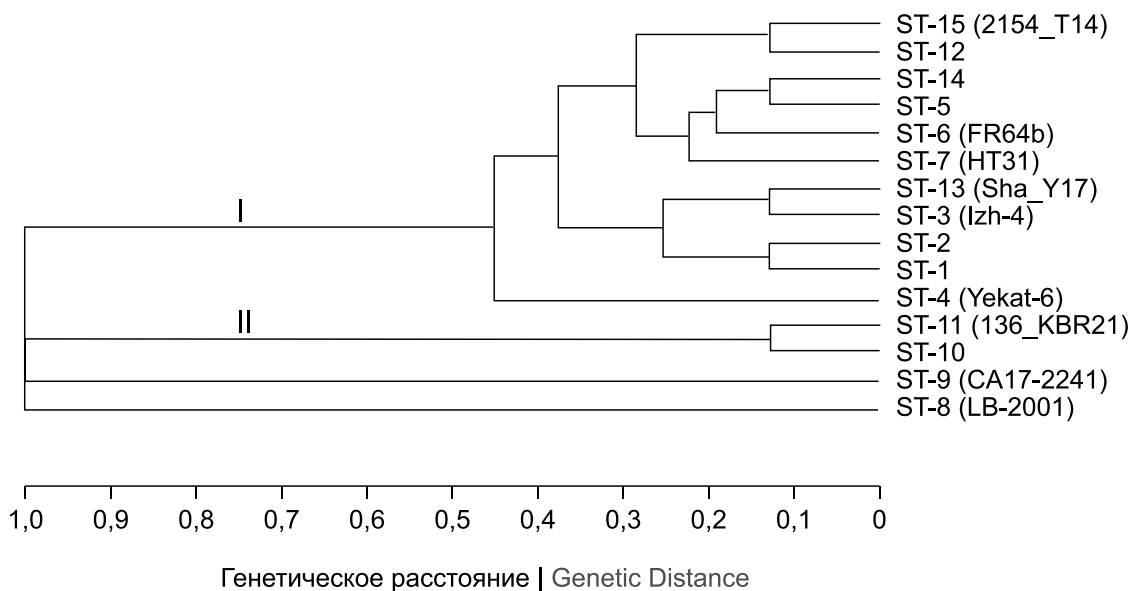
**Примечание.** \*Штамм Izh-16 отнесен к ST-1. \*\*Аллели и ST первых 9 штаммов обозначены на основании анализа полногеномных последовательностей при выборе МЛСТ-локусов, аллельные профили штамма NL-IR-1 и образцов ДНК получены при апробации схемы МЛСТ. \*\*\*Для уникальных аллелей обозначены нуклеотидные позиции МЛСТ-локусов относительно референсных последовательностей штаммов, указанных в разделе «Материалы и методы». Аллели *nusB-6* и *lysM-7* имеют идентификационные номера в базе данных GenBank OR192576 и OR134830 соответственно.

**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.

лея (*nusB-4* и *nusB-6* в аллельных профилях ST-10 и ST-11), содержащие инсерцию 6 нуклеотидов.

При разработке схемы МЛСТ *in silico* были найдены 9 ST у 10 штаммов. Для 9 штаммов провели секвенирование фрагментов генов, вошедших в схему МЛСТ, при этом дискордантных результатов при сравнении с данными полногеномного секвенирования, представленными в GenBank, не выявлено. При последующем анализе нуклеотидных

последовательностей образцов ДНК найдены ещё 6 ST, из которых 2 образованы двумя новыми аллелями и 4 — новыми сочетаниями ранее выявленных аллелей. Наиболее часто в изученной выборке встречались ST-1 (33; 36%) и ST-14 (25; 27,4%), реже — ST-12 (9; 10%), ST-10 (8; 9%), ST-2 (5; 5,5%) и ST-5 (2; 2,2%). ST-3, ST-4, ST-6, ST-7, ST-8, ST-9, ST-11, ST-13 и ST-15 встречались однократно (по 1,1%).



Генетические взаимоотношения ST, найденные внутри вида *B. miyamotoi*, определённые на основании количества несовпадений в аллельных профилях (алгоритм UPGMA).

В скобках приведено обозначение источников ДНК для ST, найденных однократно. Римская цифра — обозначение клональных комплексов.

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.

На рисунке представлена дендрограмма, иллюстрирующая генетические взаимоотношения ST. Дендрограмма и результаты, представленные в табл. 1, объединяют данные о 91 представителе вида *B. miyamotoi* из разных источников.

### Обсуждение

Представленные на рисунке генетические взаимоотношения *B. miyamotoi*, определённые на основании анализа количества несовпадений в аллельных профилях, позволяют классифицировать обозначенные ST на 4 группы. Первым 2 группам соответствуют клональные комплексы, обозначенные на рисунке как I и II, 2 другие группы образованы ST-8 и ST-9, которые имеют отличия по всем 8 локусам друг от друга и от остальных ST.

Первый клональный комплекс (I) объединяет 11 ST, которым соответствуют 80 (88%) охарактеризованных штаммов и образцов ДНК. ST-14 может быть обозначен как центральный, поскольку соответствующий ему аллельный профиль имеет максимальное количество несовпадений по 1 МЛСТ-локусу от аллельных профилей других ST этого клонального комплекса, равное 4. Второй клональный комплекс (II) образован ST-10 и ST-11, найденными у 8 (8,7%) образцов ДНК и 1 (1,1%) штамма. Аллельные профили ST-10 и ST-11 имеют несовпадения по 1 МЛСТ-локусу и отличаются от аллельных профилей ST I клонального комплекса по всем 8 МЛСТ-локусам.

В табл. 1 представлены ST и характеристика источников ДНК *B. miyamotoi*. Большинство охарактеризованных образцов ДНК имеют ST, найденные как в выборках образцов от пациентов ИКБ-БМ, так и в суспензиях клещей. Однократно найденные у возбудителей ИКБ-БМ ST-3, ST-4 и ST-13 и обнаруженные в суспензиях клещей ST-6, ST-7, ST-11 и ST-15 не позволяют делать вывод об особенностях генотипов, ассоциированных со случаями заболевания ИКБ-БМ. Предположительно все представители I клонального комплекса, найденные в переносчиках, могут вызывать ИКБ-БМ.

Выраженные генетические отличия охарактеризованных *B. miyamotoi* связаны с источниками ДНК *B. miyamotoi*. Все входящие в I клональный комплекс возбудители выделены из суспензий клещей вида *I. persulcatus*, полученных на территории России. Также в I клональный комплекс входят штаммы FR64b и HT31, выделенные на территории Японии из того же вида переносчиков. Входящие во II клональный комплекс ST были найдены в суспензиях клещей вида *I. ricinus*, полученных из европейских стран и в Кабардино-Балкарской Республике. *B. miyamotoi* ST-8 и ST-9 выделены из клещей видов *I. scapularis* и *I. pacificus* соответственно, распространенных в Северной Америке.

Таким образом, предложенная на основании МЛСТ классификация подтверждает продемонстрированную ранее генетическую гетерогенность популяций *B. miyamotoi*, соответствующих ази-

атскому (клональный комплекс I), европейскому (клональный комплекс II) и американскому (ST, не входящие в клональные комплексы I и II) генотипам [1, 14, 15], циркулирующим на разных континентах, что связано с экологически не связанными переносчиками возбудителей.

### Заключение

В данном исследовании на основании имеющихся полногеномных данных разработана схема МЛСТ, позволяющая дифференцировать возбудителей ИКБ-БМ, собранных на разных территориях. На примере распределения ST I клонального комплекса можно сделать вывод о наиболее распространённых вариантах *B. miyamotoi*, циркулирующих на территории России и некоторых зарубежных стран. Данный подход может стать удобным инструментом для мониторинга возбудителей ИКБ-БМ и характеристики эволюционных изменений в описанных клональных комплексах. Применение МЛСТ предполагает исследование образцов биологического материала после качественного обнаружения ДНК *B. miyamotoi* или получения культуры возбудителя. В связи со сложностью культивирования *B. miyamotoi* основная масса возбудителей ИКБ-БМ может быть охарактеризована с использованием МЛСТ и только незначительная часть — с использованием полногеномного секвенирования, которое на современном этапе необходимо для исчерпывающего анализа эволюционных изменений, происходящих в бактериальных популяциях.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на расширение выборки охарактеризованных изолятов, в том числе валидацию разработанной схемы МЛСТ *in silico* с использованием информации о нуклеотидных последовательностях, опубликованных в GenBank, а также на поиск возможных связей описанных ST и антигенных вариантов *B. miyamotoi*, определяемых на основе данных типирования основных поверхностных белков [2]. После расширенной апробации предлагаемой схемы МЛСТ может быть рассмотрена возможность объединения всех полученных данных в общую базу данных, аналогично существующим стандартам для внутривидовой характеристики других патогенов [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/yabrqr>
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>

#### Информация об авторах

*Миронов Константин Олегович*<sup>✉</sup> — д.м.н., зав. лаб. молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [mironov@pcr.ru](mailto: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

#### Information about the authors

*Konstantin O. Mironov*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of molecular methods for genetic polymorphisms research, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, [mironov@pcr.ru](mailto: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



## Характеристика бактерионосительства *Streptococcus pneumoniae* в детской популяции

Исаева Г.Ш.<sup>1,2✉</sup>, Зарипова А.З.<sup>2,3</sup>, Баязитова Л.Т.<sup>1,2</sup>, Хусаинова Р.М.<sup>1,2</sup>,  
Чазова Т.А.<sup>1</sup>, Тюпкина О.Ф.<sup>1</sup>, Никитина Е.В.<sup>4</sup>, Цветкова И.А.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия;

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

<sup>3</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан), Казань, Россия;

<sup>4</sup>Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>5</sup>Санкт-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 сиквенс-типов ST1025. Изолят 105\_Kz (серотип 11D) относился к другому распространённому сиквенс-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 сиквенс-типа.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pneumoniae*, бактерионосительство, серотипы, сиквенс-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>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-445>

# Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* carriage in the pediatric population

Guzel Sh. Isaeva<sup>1,2✉</sup>, Albina Z. Zaripova<sup>2,3</sup>, Lira T. Bayazitova<sup>1,2</sup>, Ralina M. Khusainova<sup>1,2</sup>, Tatiana A. Chazova<sup>1</sup>, Olga F. Tyupkina<sup>1</sup>, Ekaterina V. Nikitina<sup>4</sup>, Irina A. Tsvetkova<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

<sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russia;

<sup>4</sup>Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia;

<sup>5</sup>St. 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>

## Введение

Среди бактериальных респираторных патогенов одно из ведущих мест принадлежит *Streptococcus pneumoniae*. Инфекции, вызываемые данным микроорганизмом, продолжают сохранять свою актуальность, при этом дети младшего возраста и пожилые люди относятся к группе высокого риска [1]. В соответствии со структурой капсульного полисахарида на сегодняшний день выявлено 100 серотипов *S. pneumoniae* [2]. Широкое применение молекулярно-генетических методов позволяет проводить дальнейшую дифференциацию пневмококков по клонам и сиквенс-типам. Спектр доминирующих серотипов может зависеть от возраста обследуемых и географического региона, хотя для различных стран выявляются сходные закономерности распределения. По данным многоцентровых исследований, более 80% случаев инвазивной пневмококковой инфекции (ИПИ) во всех возрастных группах приходится на долю приблизительно 20 серотипов, при этом 13 из наиболее часто встречающихся серотипов ответственны за 70–75% случаев ИПИ у детей [3].

В состав пневмококковых вакцин включаются наиболее актуальные серотипы, которые ассоциируются с ИПИ. После введения специфической профилактики пневмококковой инфекции в национальные программы иммунизации детей наблюдается увеличение иммунной прослойки не только среди детского населения, но и среди взрослых. В рамках исследовательского проекта по оценке смены и распространения серотипов возбудителя пневмококковой инфекции были проанализированы данные из 44 пунктов эпиднадзора (Европы, Северной Америки, Африки, Латинской Америки, Азии и Океании) для изучения непосредственного и опосредованного влияния планового использования детских программ вакцинации 10- и 13-валентными пневмококковыми конъюгированными вакцинами (ПКВ-10 и ПКВ-13) в отношении заболеваемости ИПИ. Установлено, что проведение плановой иммунизации детей ПКВ привело к снижению на 85% ИПИ среди детей и взрослых всех возрастов через 6 лет после внедрения вакцины [3].

Несмотря на несомненные достижения вакцинопрофилактики, к которым можно отнести снижение ИПИ во всех возрастных группах вакцинированных и невакцинированных лиц, есть данные об увеличении частоты колонизации носоглотки невакцинированными и нетипируемыми, в том числе инкапсулированными штаммами пневмококков. Многочисленные исследования эффективности ПКВ-13 в различных регионах показали, что применение этой вакцины может не только снизить заболеваемость пневмококковой инфекцией, но и вызвать изменения в серотиповом составе циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* [4, 5].

Одним из приоритетных направлений контроля за пневмококковой инфекцией является проведение научных исследований по изучению непосредственного и опосредованного влияния вакцинации на результаты заболеваемости и носительства после введения на различных территориях ПКВ детскому населению.

**Целью** нашего исследования стало изучение региональных особенностей бактерионосительства *S. pneumoniae* в детской популяции и характеристика доминирующих серотипов возбудителя.

## Материалы и методы

В рамках регионального мониторинга на территории Республики Татарстан в 2020–2022 гг. были обследованы 509 детей в возрасте от 3 лет до 5 лет 11 мес 29 дней в соответствии с критериями включения (приемлемый возраст, подписание родителями или законными представителями формы добровольного информированного согласия). Исследования были одобрены Локальным этическим комитетом КНИИЭМ (протокол № 1 от 12.03.2020). В группу здоровых детей ( $n = 509$ ) были включены организованные дети, посещающие детские дошкольные учреждения г. Казани ( $n = 204$ ) и п.г.т. Высокая Гора ( $n = 305$ ), при отсутствии признаков острого респираторного заболевания. Вакцинальный статус детей изучали по картам развития ребёнка.

Материалом для исследования являлись мазки из носоглотки. Для сбора и транспортировки биоматериала использовали систему сбора и транспортировки жидкостей «ESwab» («Coran»). *S. pneumoniae* определяли бактериологическим и молекулярно-биологическим методами. Культивирование было выполнено на колумбийском агаре СНА с 5% дефибрированной овечьей кровью («Sredoff»). Чашки Петри инкубировали 18–24 ч при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Идентификацию *S. pneumoniae* проводили по морфологическим (грамположительные диплококки), культуральным (колонии S-формы с альфа-гемолизом), биохимическим свойствам (тест на каталазу, чувствительность к оптохину и солям желчи) в соответствии с методическими рекомендациями<sup>1</sup>.

ДНК из чистых культур *S. pneumoniae* выделяли с помощью набора «AmpliSens DNA-Sorb-B Nucleic Acid Extraction Kit» («InterLabService»). Типирование полученных образцов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили в два этапа. Первый этап — выявление маркерных генов

<sup>1</sup> Методические рекомендации МР 4.2. 0114-16 «Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ).

*S. pneumoniae* *lytA* и *cpsA*; второй этап — определение серотипа методом ПЦР в реальном времени с использованием меченных флуоресцентными метками олигонуклеотидов и праймеров в соответствии с рекомендациями CDC<sup>2</sup>: 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. Изоляты *S. pneumoniae*, которые не были отнесены к изучаемым группам, были обозначены как нетипируемые.

Для 2 изолятов *S. pneumoniae*, серотиповая принадлежность которых была определена методом ПЦР как 15AF и 11AD, выполнено полногеномное секвенирование (WGS). При этом анализ генома первого изолята показал его принадлежность к серотипу 15C (*Streptococcus pneumoniae* 105\_Kz CP125291), а второго изолята — к серотипу 11D (*Streptococcus pneumoniae* 105\_Kz CP125291). Данные загружены в GenBank (BioProject PRJNA971376 (NZ\_CP126249.1) и PRJNA1009429). Выбор серотипов для секвенирования объясняется существенным распространением пневмококков серогрупп 15 и 11 на фоне вакцинации, при этом только серотипы 11A, 15A и 15C включены в новую ПКВ-20 («Pfizer») [6], серотипы 11A и 15B — в состав ПБ23.

Для WGS ДНК из чистых культур *S. pneumoniae* выделяли при помощи набора «QIAamp DNA Mini Kit» («Qiagen»). WGS выполняли на платформах «DNBSEQ-G50» («MGI») и «GridION» («Oxford Nanopore Technologies»). Библиотеки для WGS готовили при помощи наборов «MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set» («MGI»), «Native Barcoding Expansion» и «Ligation Sequencing Kit» («Oxford Nanopore Technologies») соответственно. Медиана длины фрагментов библиотеки составила 430 bp (идентифицировано с помощью системы капиллярного гель-электрофореза «QIAxcel Advanced System»). Секвенирование с получением парно-концевых прочтений выполняли на платформе «DNBSEQ-G50» («MGI») с использованием набора «DNBSEQ-G50RS» (FCL PE150/FCS PE150).

Качество полученных нуклеотидных последовательностей оценивали с помощью программы «FastQC v. 0.11.8» («Babraham Bioinformatics»). Фильтрация ридов по качеству и удаление адаптеров и праймеров ПЦР, используемых при подготовке библиотек, выполнены с помощью программы «Cutadapt v. 1.15». Для сборки геномов *de novo* использовали алгоритм «SPAdes v. 3.15.4» [7], для гибридной сборки — «Unicycler v. 0.4.7» [8]. Финальная оценка качества была выполнена с помощью программы «Quast v. 5.0.2» [9]. Опреде-

ление сиквенс-типа по схеме MLST-типирования (Multilocus sequence typing) было выполнено с помощью программы «MLST v. 2.0»<sup>3</sup> [10]. Геномы были аннотированы с помощью сервера RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology) [11]. Для идентификации генов и мутаций, ассоциирующихся с устойчивостью к антибиотикам, использовали базу данных CARD [12]. Поиск последовательностей профагов в геномах изучаемых изолятов выполняли с помощью онлайн-сервиса Phaster [13], поиск островков патогенности в геномах — с помощью онлайн-сервиса «IslandViewer v. 4» [14].

Полученные в процессе исследования результаты обрабатывали с помощью программной системы «Statistica for Windows v. 6.0». Критерием статистической достоверности получаемых данных считали уровень  $p < 0,05$ .

## Результаты

Бактерионосительство *S. pneumoniae* в группе здоровых детей выявлено у 207 (40,7%) детей, при этом частота обнаружения *S. pneumoniae* у детей, проживающих в Казани, была достоверно выше, чем у детей, проживающих в сельской местности, — 53,4 и 31,1% соответственно ( $p < 0,05$ ). При изучении вакцинального статуса по картам развития ребёнка установлено, что из 509 здоровых детей 315 человек было вакцинировано ПКВ-13 (табл. 1). Из 207 носителей *S. pneumoniae* было вакцинировано 134 ребёнка, при этом полный курс вакцинации прошли 43 ребёнка, получили 2 дозы — 47 и только 1 дозу — 44.

По данным Республиканского центра иммунопрофилактики, вакцинация детского населения против пневмококковой инфекции проводится в Республике Татарстан согласно национальному календарю профилактических прививок с 2014 г. Для вакцинации используется пневмококковая вакцина ПКВ-13 в соответствии со схемой, которая включает проведение вакцинации в 2, 4, 5 мес и ревакцинации в 15 мес. По состоянию на 01.01.2021 среди детей в возрасте 0–7 лет 82% детей были привиты 1–3 дозами вакцины, при этом доля прошедших полный курс вакцинации и ревакцинации составила 60,4%.

Среди вакцинированных детей в большинстве случаев (57,5%) носительства *S. pneumoniae* не наблюдалось. Только у 20,7% детей, прошедших полный курс вакцинации, выявлено бактерионосительство *S. pneumoniae* ( $p < 0,01$ ). Таким образом, в большинстве случаев бактерионосителями являлись невакцинированные или не прошедшие полный курс вакцинации дети.

При изучении степени обсеменённости носоглотки *S. pneumoniae* установлено, что низкая об-

<sup>2</sup> 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/per-oligonucleotide-primers.pdf>

<sup>3</sup> Center for Genomic Epidemiology. URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/MLST>

**Таблица 1.** Частота бактерионосительства *S. pneumoniae* у вакцинированных здоровых детей, *n* (%)  
**Table 1.** The frequency of *S. pneumoniae* bacterial carriage in vaccinated healthy children, *n* (%)

Вакцинация Vaccination	Число вакцинированных детей Number of vaccinated children	Число детей без носительства <i>S. pneumoniae</i> Number of children who are not <i>S. pneumoniae</i> carriers	Число детей — бактерионосителей <i>S. pneumoniae</i> 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%)
Всего   Total	315	181 (57,4%)	134 (42,5%)*

**Примечание.** \**p* < 0,01 по сравнению с группой без носительства.  
**Note.** \**p* < 0.01 compared to the non-carrier group.

семенённость ( $10^1$ – $10^2$  КОЕ/тампон) наблюдалась в 62 (30%) случаях, умеренная ( $10^3$ – $10^4$  КОЕ/тампон) — в 113 (54,6%), высокая ( $10^5$ – $10^6$  КОЕ/тампон) — в 32 (15,4%). При этом в группах детей-бактерионосителей — как вакцинированных, так и невакцинированных — преобладала умеренная степень обсеменённости, достоверных различий по степени обсеменённости в зависимости от вакцинации ПКВ-13 не установлено (**табл. 2**).

Нами был изучен серотиповой состав штаммов пневмококков, выделенных от здоровых детей, и проанализирован в зависимости от вакцинального статуса бактерионосителя (**табл. 3**).

Общее число идентифицированных серотипов изолятов *S. pneumoniae*, выделенных из мазков из носоглотки, превысило число выделенных культур, что указывает на микст-колонизацию несколькими серотипами (от 2 до 4), при этом в большинстве случаев смешанная колонизация чаще наблюдалась у вакцинированных детей. Данный феномен также был отмечен другими исследователями [15].

Результаты анализа серотипового состава указывают на низкий охват циркулирующих среди детей-носителей серотипов применяемыми на территории России пневмококковыми вакцинами, при этом в ходе исследования нам не удалось дифференцировать отдельные серотипы в составе не-

которых серогрупп. Полученные результаты можно оценивать как ориентировочные и требующие дальнейшей расшифровки. Доля серотипов, входящих в состав вакцины ПКВ-13, составила 24,7%, а на долю вакцинных серотипов 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины (ППСВ-23), не применяющейся для вакцинации детей, — 33%. Доля невакцинных серотипов составила 32,1%, нетипируемых — 10,2%. Анализ серотипового состава в зависимости от вакцинального статуса ребёнка показал значительные отличия в частоте распространения серотипов. У невакцинированных детей преобладали серотипы, относящиеся к вакцинным, — 6ABCD (21%), 11AD (15%), 14 (13%), хотя в ряде серогрупп нам не удалось дифференцировать вакцинные и невакцинные серотипы. У вакцинированных детей доминировали 15AF (17,4%), 23A (19,2%), т.е. серотипы, не входящие в состав действующих вакцин, и 11AD (19,6%) — часть серогруппы, представитель которой (11A) входит в состав ППСВ-23, крайне редко используемой для профилактики пневмококковой инфекции у детей.

Из изолятов, ассоциирующихся с наиболее распространёнными среди детей-носителей серогруппами 15 и 11, не входящими в применяемую вакцину ПКВ-13, были выбраны для секвенирования по одному репрезентативному изоляту (**табл. 4**). Изолят

**Таблица 2.** Степень обсеменённости носоглотки *S. pneumoniae* в зависимости от вакцинации ПКВ-13, *n* (%)  
**Table 2.** The degree of *S. pneumoniae* contamination of the nasopharynx depending on vaccination by PCV-13, *n* (%)

Степень обсеменённости The degree of contamination	Число детей — носителей <i>S. pneumoniae</i> Number of <i>S. pneumoniae</i> carrier children	Число случаев носительства <i>S. pneumoniae</i> у вакцинированных детей The number of cases of <i>S. pneumoniae</i> carriage in vaccinated children	Число случаев носительства <i>S. pneumoniae</i> у невакцинированных детей Number of cases of <i>S. pneumoniae</i> carriage in unvaccinated children	<i>p</i>
Низкая Low	62 (30%)	35 (26,2%)	27 (43,5%)	0,152
Умеренная Medium	113 (54,6%)	78 (58,2%)	35 (47,1)	< 0,01
Высокая High	32 (15,4%)	21 (15,6%)	11 (34,4%)	0,013
Всего Total	207	134 (64,7%)	73 (35,3%)	< 0,01

**Таблица 3.** Серотиповой состав *S. pneumoniae*, выделенных от здоровых детей-бактерионосителей в зависимости от вакцинального статуса, *n* (%)**Table 3.** Serotype composition of *S. pneumoniae* isolated from healthy bacterial carrier children depending on the vaccination status, *n* (%)

Вакцина Vaccine	Идентифицированные серотипы Identified serotypes	Всего вакциниро- ванные и невакци- нированные All vaccinated and unvaccinated	Невакцинирован- ные ПКВ-13 Unvaccinated with PCV-13	Вакцинированные ПКВ-13 Vaccinated with PCV-13	<i>p</i>
	4	0	0	0	–
	6ABCD (в составе ПКВ-13 только 6A и 6B)* 6ABCD (only 6A and 6B are included in PCV-13)*	48	21 (43,75%)	27 (56,25%)	0,223
	9AV (в составе ПКВ-13 только 9V)* 9AV (only 9V is included in PCV-13)*	0	0	0	–
	14	20	13 (65%)	7 (35%)	0,061
ПКВ-13 Вакцинные серотипы PCV-13 vaccine serotypes	18ABCF (в составе ПКВ-13 только 18C)* 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 (в составе ПКВ-13 только 7F)* 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	–
	2	1	1	0	–
	8	0	0	0	–
	9LN (в составе ППСВ-23 только 9N)* 9LN (only 9N is included in PPSV-23)*	28	11 (39,29%)	17 (60,71%)	0,112
	10A	0	0	0	–
ППСВ-23 Вакцинные серотипы PPSV-23 Vaccine serotypes	11AD (в составе ППСВ-23 только 11A)* 11AD (only 11A is included in PPSV-23)*	59	15 (25,42%)	44 (74,58%)	0,214
	12F	3	0	3	–
	15BC (в составе ППСВ-23 только 15B)* 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 (только 12F — в составе ППСВ-23)* 12AF (only 12F is included in PPSV-23)*	0	0	0	–
Невакцинные серотипы 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
Нетипируемые серотипы Untyped serotypes	–	33	13 (39,39%)	20 (60,61%)	0,087
Итого Total		324	100 (30,86%)	224 (69,14%)	0,216

**Примечание.** \*Серотипы некоторых серогрупп не были дифференцированы методом ПЦР в реальном времени.**Note.** \*Serotypes of some serogroups were not differentiated by real-time PCR.

**Таблица 4.** Характеристика геномов изолятов серотипов 15C и 11D, полученных из мазка из носоглотки детей с установленным носительством *S. pneumoniae*

**Table 4.** Characteristics of genomes of serotypes 15C and 11D isolates obtained from nasopharyngeal swabs of children with identified *S. pneumoniae* carriage

Образец Sample	Номер в Genbank Genbank accession number	Год выделения Year of isolation	Серотип Serotype	Сиквенс-тип Sequence type	Возраст пациента, лет 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

**Примечание.** PEN — пенициллин; ERY — эритромицин; TET — тетрациклин; CHL — хлорамфеникол; TXT — ко-тримоксазол; R — наличие, S — отсутствие детерминант резистентности.

**Источник:** Прогнозирование устойчивости к противомикробным препаратам в PATRIC и RAST. URL: <https://www.bv-brc.org/job>

**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>

27\_Kz (серотип 15C) принадлежал к сиквенс-типу ST1025. Геном изолята 27\_Kz содержал один интактный профаг (*Streptococcus phage SpSL1*, NC\_027396(23), 39,7 т.п.н.) и остатки 3 профагов. В геноме 27\_Kz присутствовали компоненты фосфотрансферазных систем различной специфичности (галактозо-специфичной, маннитол-специфичной, бета-глюкозидазо-специфичной, целлобиозо-специфичной); гены сортаз; ген IgA1-протеазы; гены синтеза лантионин-содержащего бактериоцина LanM; гены синтеза аспарагина; локус *riaABCD* (кодирующий транспортёры ионов железа); гены ABC-транспортёров различной специфичности (аминокислоты, полиамины, ионы металлов). Варианты системы рестрикции-модификации I типа (типы S-субъединиц специфичности) изолята 27\_Kz ассоциировались с патогенностью (на основании аннотации в «IslandViewer v. 4»). Наличие детерминант резистентности к антибиотикам разных классов было предсказано с использованием RAST-онлайн-сервера. В геноме 27\_Kz был идентифицирован ассоциированный с резистентностью к триметоприму вариант гена дигидрофолат редуктазы *folA* (табл. 4).

Изолят 105\_Kz (серотип 11D) принадлежал к ST62. В геноме изолята 105\_Kz присутствовали остатки 4 профагов и мобильный генетический элемент Tn5252, содержащий локус синтеза лантибиотиков. Геном изолята 105\_Kz также содержал компоненты фосфотрансферазных систем различной специфичности, гены сортаз, ген IgA1-протеазы, локус *riaABCD*, гены ABC-транспортёров различной специфичности (аминокислоты, полиамины, ионы металлов). Изолят 105\_Kz отличался наличием гена цитозин-ДНК-метилтрансферазы (большинство генетических линий *S. pneumoniae* содержат аденин-ДНК-метилтрансферазы). Наличие малораспространённой среди *S. pneumoniae* цитозин-специфичной метилтрансферазы может объяснять отсутствие интактных профагов в гено-

ме данного штамма, а также может быть связано с генетической стабилизацией и распространением ST62. Кроме того, изолят 105\_Kz имеет АТФ-синтазы V (не F-типа) и может иметь особенности энергетического метаболизма.

Таким образом, на фоне вакцинации в России происходит распространение серогрупп 15 и 11 у детей — носителей *S. pneumoniae*, представители которых могут ассоциироваться с генетическими линиями с потенциально повышенной вирулентностью или другими адаптивными изменениями, обеспечивающими стабилизацию и успешное распространение данных клонов.

## Обсуждение

Результаты нашего исследования показывают, что вакцинация ПКВ-13 полностью не исключает явления бактерионосительства среди детей дошкольного возраста, но при этом дети, прошедшие полный курс вакцинации и ревакцинации, имеют достоверно более низкие показатели частоты бактерионосительства по сравнению с группой детей, не прошедших вакцинацию либо её полный курс. Нами не выявлено влияния вакцинации на степень обсеменённости носоглотки пневмококками у здоровых детей-бактерионосителей. Возможно, на степень колонизации оказывают воздействие другие факторы, связанные с иммунологическими особенностями макроорганизма, вирулентностью возбудителя или факторами окружающей среды, что, несомненно, требует проведения дальнейших исследований.

В нашей работе установлена корреляция между частотой бактерионосительства и средой проживания ребёнка: у городских детей частота колонизации носоглотки *S. pneumoniae* была достоверно выше, чем у детей, проживающих в сельской местности, что можно объяснить большими контактами в городской среде. Эти данные должны быть учтены при планировании региональных мониторин-



говых исследований за циркуляцией *S. pneumoniae* среди разных групп детского населения. Мониторинговые исследования, проводимые в различных странах, указывают на существование общих закономерностей в распределении серотипового состава *S. pneumoniae* после введения плановой иммунизации. Так, в Португалии ПКВ-13 стала доступна с 2010 г., после десятилетия использования ПКВ-7. S. Felix и соавт. оценивали изменения в распределении серотипов и чувствительности к противомикробным препаратам пневмококков, переносимых детьми, проживающих в двух регионах Португалии (одном городском и одном сельском), за 3 эпидемиологических периода: до введения ПКВ-13 (2009–2010), ранний ПКВ-13-период (2011–2012) и поздний ПКВ-13-период (2015–2016) [16]. Изучали образцы из носоглотки ( $n = 4232$ ), полученные от детей в возрасте 0–6 лет, посещающих центры дневного ухода. Уровень иммунизации ПКВ-13 был очень высоким в обоих регионах ( $> 75\%$ ). Носительство пневмококка оставалось стабильно высоким: 62,1, 62,4 и 61,6% в изучаемые периоды соответственно ( $p = 0,909$ ) в городском регионе и 59,8, 62,8, 59,5% ( $p = 0,543$ ) в сельском регионе. При этом носительство серотипов, входящих в состав ПКВ-13, снизилось как в городах (16,4, 7,3 и 1,6%;  $p < 0,001$ ), так и в сельских районах (13,2, 7,8 и 1,9%;  $p < 0,001$ ). Это снижение было в основном связано с серотипом 19A (14,1, 4,4 и 1,3% в городском регионе и 11,1, 3,6 и 0,8% в сельском регионе;  $p < 0,001$ ), в то время как серотипы 11D, 15A/B/C, 16F, 21, 22F, 23A/B, 24F, 35F и нетипизируемые варианты были наиболее распространены в поздних стадиях иммунизации ПКВ-13 [16].

Мониторинг серотипового состава циркулирующих пневмококков позволил в нашем исследовании выявить некоторые тенденции в структуре доминирующих серотипов в зависимости от вакцинального статуса детей. Так, нами установлено, что, несмотря на преобладание вакцинных серотипов, доля вариантов *S. pneumoniae*, входящих в состав ПКВ-13, имеет тенденцию к снижению и замещению на серотипы, не входящие в её состав. Процессы замещения серотипов мы наблюдали в обеих группах, но с различной интенсивностью. В группах вакцинированных детей отмечено большее генетическое разнообразие с преобладанием невакцинных серотипов (15AF — 17,4%; 23A — 19,2%), тогда как в группе невакцинированных детей их доля ниже (15AF — 10%; 23A — 11%).

О процессах замещения вакцинных серотипов на невакцинные исследователи стали сообщать вскоре после начала внедрения в различных странах массовой иммунизации ПКВ. После введения в плановую иммунизацию ПКВ-7 в США в 2003–2005 гг. появились сообщения о глубоких изменениях в распределении серотипов, колонизирующих

носоглотку детей, при этом некоторые из невакцинных серотипов приобретают наибольшее распространение и становятся всё более агрессивными за счёт антибиотикорезистентности [17, 18].

С момента внедрения ПКВ-13 исследователи из стран, включивших эту вакцину в свои национальные программы иммунизации, стали сообщать об увеличении числа случаев инфицирования *S. pneumoniae* серогруппы 15, которая не охватывается данной вакциной [19–21]. Пневмококки этой серогруппы вызывали вспышки и смертельные случаи среди детей [22, 23].

В Китае в результате непрерывного мониторинга в Пекинской детской больнице, частично отражающего распространённость *S. pneumoniae* у китайских детей за период исследования, циркуляция пневмококков серогруппы 15 среди детского населения составила 6,12%. После введения ПКВ-13 в Китае в мае 2017 г. показатели выделения *S. pneumoniae* серогруппы 15 в 2018 и 2019 гг. составили 7,41 и 10,53% соответственно, демонстрируя тенденцию к росту [24]. Китайские исследователи обнаружили, что штаммы *S. pneumoniae* серогруппы 15 проявляют хорошую чувствительность к распространённым антибиотикам, однако наиболее распространённый клональный комплекс (СС) СС3397 был в 100% случаев устойчив к пенициллину, на основании чего было сделано предположение о влиянии антибиотиков на изменение доминирующих СС [24]. Во многих исследованиях ранее сообщалось о явлениях клонального сдвига в других серотипах, например, СС271 заменил СС983 среди штаммов серотипа 19F [25], ST81 заменил ST342 среди изолятов пневмококка серотипа 23F [26], СС320 заменил СС230 в штаммах 19A [27], СС876 заменил СС875 в штаммах серотипа 14 [28]. Эти примеры явлений клонального сдвига у одного серотипа могут быть вызваны селекционным действием антибиотиков, согласно которому сиквенс-типы, экспрессирующие высокую устойчивость к антибиотикам, заменяют сиквенс-типы с меньшей резистентностью. Для подтверждения данной теории необходимы длительные эпидемиологические исследования антибиотикорезистентности штаммов *S. pneumoniae* среди различных серотипов, в том числе серогруппы 15.

За период наших наблюдений с 2016 г. мы также отмечаем тенденцию роста распространённости серотипов серогруппы 15: доля серотипов 15AF в 2016–2019 и 2020–2021 гг. выросла с 2,4 до 7,0%, при этом в группе вакцинированных детей в 2021 г. она составила 17,4%, для части серогруппы 15BC также отмечается динамика роста с 2,4% в 2016 г. до 3,9% в 2019 г. [29]. Как известно, серотипы 15B, 15A и 15C серогруппы 15 являются одними из наиболее распространённых серотипов *S. pneumoniae*, ассоциированных с инвазивными пневмококковыми

ми заболеваниями после внедрения ПКВ-13, кроме того, 15В вносит значительный вклад в развитие острого среднего отита. Капсульные полисахариды серотипов 15А, 15В и 15С тесно связаны между собой, причём 15А имеет линейную структуру повторяющихся единиц, а 15В и 15С — разветвлённую структуру повторяющихся единиц углеводных остатков [30].

По результатам российских многоцентровых исследований «ПеГАС» 2015–2018 гг. по изучению инвазивных штаммов *S. pneumoniae* установлены доминирующие серотипы, принадлежащие к серогруппам 3 (21%), 19F и 6АВЕ (по 11%), 15В (6,5%). У всех 46 изученных штаммов были определены сиквенс-типы и выявлено 6 не описанных ранее сиквенс-типов: ST15247–ST15252, при этом проведённое мультилокусное секвенирование-типирование не позволило выявить преобладающий сиквенс-тип или определить СС, за исключением штаммов серотипа 3 [31]. По результатам другого многоцентрового исследования, проводимого с 2016 г., в России преимущественно распространены генетические линии СС505 (серотип 3), СС236/СС271/СС320 (19F), СС1025 (15ВС), СС143 (различные серотипы), СС311 (23F), которые часто ассоциируются с инвазивными заболеваниями. Для СС1025, к которой относится серотип 15ВС, также отмечена тенденция к возрастанию численности. Генетические линии СС505, СС1025 и СС311 ассоциируются с чувствительностью к большинству классов антибиотиков. Геномы представителей распространённых генетических линий несут разнообразные детерминанты вирулентности [32].

### Заключение

Проведённые исследования указывают на высокую частоту колонизации носоглотки у детей дошкольного возраста, особенно среди городских детей. При этом на серотиповой пейзаж оказывает влияние вакцинальный статус ребёнка: установлены достоверные различия по частоте встречаемости различных серотипов у вакцинированных и невакцинированных детей. На современном этапе проведение мониторинга только за серотиповым (серогрупповым) составом циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* недостаточно. В целях совершенствования эпидемиологического надзора за пневмококковыми инфекциями необходимо внедрение мониторинга за циркулирующими СС пневмококков и анализ генетических детерминант антибиотикорезистентности в зависимости от ST с применением WGS и биоинформатического анализа.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Фе-

дерации 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 100<sup>th</sup> 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. Prjibelski 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., Piliashvili 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 антибиотико-резистентности 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/ztiywx>
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. *Эпидемиология 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., Mikhaylova Yu.V., 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 микробиологии.* 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/rsrufj>

### Информация об авторах

Исаева Гузель Шахатовна<sup>✉</sup> — 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](mailto: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>

### Information about the authors

Guzel Sh. Isaeva<sup>✉</sup> — 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](mailto: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>

*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, редактирование; *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

*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. Aristovskiy, 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, 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

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.<sup>1✉</sup>, Ходаков О.А.<sup>1</sup>, Михеева Т.В.<sup>2</sup>, Билалова Н.В.<sup>1</sup>,  
Конькова-Рейдман А.Б.<sup>2</sup>, Захарова Ю.А.<sup>3</sup>, Семенов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

<sup>3</sup>Федеральный 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 р51 и р66 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 Ig 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 персистирования 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., 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. *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>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-442>

## Phylogenetic position and genetic features of HIV-1 in CNS

Mikhail V. Pitserskiy<sup>1✉</sup>, Oleg A. Khodakov<sup>1</sup>, Tatyana V. Mikheeva<sup>2</sup>, Natalia V. Bilalova<sup>1</sup>, Alena B. Konkova-Reidman<sup>2</sup>, Yuliya A. Zakharova<sup>3</sup>, Aleksandr V. Semenov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>F.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/wofnfq>

## Введение

Ассоциированные с ВИЧ нейрокогнитивные расстройства являются широко распространённым явлением среди людей, живущих с ВИЧ/СПИД, несмотря на эффективную антиретровирусную терапию (АРТ). Даже в случае эффективной супрессии вируса в крови его репликация может по-прежнему наблюдаться в спинномозговой жидкости у некоторых пациентов. Это обусловлено тем, что проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для различных антиретровирусных препаратов значительно различается и концентрация некоторых препаратов в спинномозговой жидкости не достигает концентраций, необходимых для эффективного подавления репликации ВИЧ [1, 2]. Выявление ВИЧ-инфекции на поздних стадиях приводит к тому, что пациенты уже имеют клинические проявления поражения центральной нервной системы (ЦНС), которые возникают в результате повреждения, вызванного репликацией ВИЧ в ЦНС до начала эффективной АРТ [3–5].

Известно, что ВИЧ, помимо поражения клеток иммунной системы, способен проникать в ЦНС, что приводит к различного рода осложнениям, в том

числе к ВИЧ-ассоциированному нейрокогнитивному расстройству (HIV-associated neurocognitive disorder, HAND).

В соответствии с тяжестью симптомов HAND разделяется на три стадии:

- бессимптомное нейрокогнитивное расстройство;
- лёгкое нейрокогнитивное расстройство;
- ВИЧ-ассоциированная деменция [6].

Глобальное метаисследование, проведённое в 2020 г., установило, что общая распространённость HAND по миру составляет 42,6% и различается в зависимости от региона. Наибольшую распространённость HAND имеет в Южной Африке (как и наибольшее количество ВИЧ-положительных лиц) и составляет около 72% от всех случаев в мире. Около 88% всех случаев HAND представлены более мягкими формами (бессимптомное или лёгкое нейрокогнитивное расстройство), в то время как ВИЧ-ассоциированная деменция — довольно редкое явление [7, 8].

Проникновение ВИЧ в ЦНС происходит приблизительно на 4–8-й день после инфицирования, когда человеку, как правило, ещё не поставлен

диагноз ВИЧ-инфекция [9]. Вирус проходит через ГЭБ с помощью инфицированных моноцитов и Т-лимфоцитов [10, 11]. Установлено, что содержащиеся провирус ВИЧ CD14<sup>+</sup>- и CD16<sup>+</sup>-моноциты активнее проникают через ГЭБ, чем аналогичные неинфицированные клетки. Важную роль в этом процессе играют адгезивные молекулы JAM-A (junctional adhesion molecule A, или CD321) и ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule, или CD166). Взаимодействуя с микроваскулярными эндотелиальными клетками ГЭБ, они позволяют моноцитам проникать через него. Их экспрессия существенно увеличивается у инфицированных CD14<sup>+</sup>- и CD16<sup>+</sup>-моноцитов. Кроме того, увеличивается количество хемокинов в ЦНС, в частности CCL2, а на поверхности инфицированных CD14<sup>+</sup>- и CD16<sup>+</sup>-моноцитов увеличивается количество рецепторов к данному хемокину [12, 13].

Попав в ЦНС, инфицированные моноциты могут дифференцироваться в периваскулярные макрофаги, которые составят устойчивый резервуар для вируса, и будут длительно выделять вирусные частицы, заражая другие клетки ЦНС, такие как макрофаги, астроциты и микроглию, каждая из которых может тоже выступать в роли резервуара для вируса, даже в условиях продолжительного приёма антиретровирусных препаратов [14]. Инфицированные ВИЧ клетки нервной системы производят вирусные белки, такие как Tat и Nef, что приводит к хроническому воспалению на низком уровне. Причём это воспаление сохраняется даже в условиях приёма антиретровирусных препаратов [15, 16]. Первое известное лонгитюдное исследование среди пациентов с ВИЧ в возрасте 50 лет и старше установило, что приём АРТ и регулярные обследования не могут предотвратить развитие HAND [17].

В ряде исследований установлено, что эволюция ВИЧ-1 в ЦНС идёт параллельно эволюции вируса, остающегося за её пределами [18–20]. Например, белки гена *env*, штаммов из ликвора приобретают специфические формы, которые взаимодействуют с CD4 и N-концом CCR5 в тандеме, обеспечивая более эффективное проникновение вируса в макрофаги, находящиеся в ЦНС и экспрессирующие малое количество CD4 [21]. Генетические различия между популяциями ВИЧ-1, выделяемыми из плазмы и ликвора, присутствуют и в других генах, таких как *tat*, *nef*, *pol* [22–24]. Мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью, могут встречаться в штаммах как из плазмы, так и из ликвора, причём в некоторых случаях мутации лекарственной устойчивости могут присутствовать у пациента в штаммах из ликвора и отсутствовать в штаммах из плазмы [25].

Способный к репликации резервуар ВИЧ представляет собой генетически ограниченную и в целом «более молодую» подгруппу общего пу-

ла [26]. Стабильность генома ВИЧ тесно связана со структурными особенностями обратной транскриптазы ВИЧ, которая, допуская ошибки при синтезе ДНК ВИЧ, является причиной возникновения мутаций [27].

Обратная транскриптаза ВИЧ-1 представляет собой несимметричный гетеродимер, состоящий из субъединиц p51 (длиной 440 аминокислот) и p66 (длиной 560 аминокислот). Каждая субъединица содержит такие субдомены, как *fingers* (аминокислоты 1–85, 118–155), *palm* (аминокислоты 86–117, 156–236), *thumb* (аминокислоты 237–318), и соединительный субдомен (аминокислоты 319–446). Субъединица p66 также включает в себя субдомен, соединяющий её с РНКазой Н (аминокислоты 427–560). Каталитически активный центр сформирован аминокислотами 110, 185 и 186. Эти две субъединицы имеют различную пространственную организацию, и каталитически активной является только субъединица p66, в то время как p51 играет лишь структурную роль [28].

Изучение различий в трёхмерной структуре протеазы и обратной транскриптазы штаммов ВИЧ, разделённых ГЭБ, представляет интерес для выявления направления адаптационных изменений вируса, связанных с присутствием в определённом компартменте.

## Материалы и методы

В период с января 2018 г. по март 2022 г. обследовано 38 ВИЧ-инфицированных пациентов из Челябинской области с нейрокогнитивными расстройствами и тяжёлым иммунодефицитом.

Возраст пациентов в среднем составлял 39 лет (среднее квадратичное отклонение  $\sigma = 7$ , коэффициент Шапиро–Уилка  $W = 0,917$  при  $p = 0,008$ ). Среди обследованных 20 человек составили мужчины (52,63%; 95% доверительный интервал (ДИ) 37,3–67,5), 18 — женщины (47,37%; 95% ДИ 32,5–62,7). Все пациенты находились на стадии 4В ВИЧ-инфекции. 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).

Количество CD4-клеток измеряли с помощью проточного цитометра «BD FACSCanto II» и набора реагентов «BD Tritest CD4/CD8/CD3» («Becton Dickinson»). Уровень вирусной нагрузки определяли с использованием набора реагентов «АмплиСенс ВИЧ-Монитор-FRT» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора), секвенирование — с использованием набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Обработку электрофореграмм и получение консенсусной последовательности осу-



ществляли с помощью программного обеспечения «Деона 1.7.0» («Компания РМБит»).

Всего было получено 57 нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ-1, в том числе от 19 пациентов — парные образцы из плазмы крови и из ликвора и ещё от 19 пациентов РНК ВИЧ в достаточном для секвенирования количестве удалось выделить или из плазмы крови, или из ликвора. Все нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных GenBank (Accession numbers: OR260480–OR260536).

Относительно исследуемых нуклеотидных последовательностей был проведён поиск ближайших родственных геномов ВИЧ с помощью сервиса NCBI BLAST [29]. Сформирована коллекция из всех геномов ВИЧ, имеющих сходство с исходными последовательностями 95% и выше ( $n = 2929$ ). Множественное выравнивание выполняли с помощью алгоритма ClustalOmega на онлайн-сервисе EMBL [30]. Субтипирование, определение мутаций лекарственной устойчивости и прочих мутаций выполняли на сервисе Стэнфордского университета «HIV drug resistance database» («HIVdb Program: Mutations Analysis», версия программы 3.4.3; версия алгоритма 9.4) [31].

Для проведения филогенетического анализа подбор наиболее подходящей для имеющихся данных модели замены нуклеотидов осуществляли с использованием онлайн-сервиса «FindModel» [32]. Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия с моделью замены нуклеотидов GTR+G (General Time Reversible + gamma) с использованием программного обеспечения «MEGA X» [33]. В качестве меры статистической поддержки использовали 500 бутстреп-репликаций.

Для филогенетического анализа парных образцов генома штаммов ВИЧ, выделенных из плазмы крови и ликвора 19 пациентов, в качестве выборки сравнения добавили геномы ВИЧ, представляющие различные субтипы: А6 (EU861977, KU749403, KT983615, JX500694), В (JX500708) и CRF63\_02A6 (JN230353). Указанные штаммы являются референсными для субтипов и циркулирующих рекомбинантных штаммов ВИЧ по версии «Los Alamos HIV databases» [34].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного продукта «Statistica v. 12» («StatSoft Russia»). Расчёт доверительных интервалов осуществляли по методу Уилсона для уровня ошибки 1-го типа 0,05 [35]. Для подтверждения статистически значимого различия использовали критерии непараметрической статистики ( $\chi^2$ , точный критерий Фишера, критерий Манна–Уитни).

Трёхмерные модели вирусных белков (протеазы и обратной транскриптазы) были получены методом гомологического построения. Для протеазы была использована модель кристаллической струк-

туры протеазы ВИЧ-1, субтипа А (PDB ID: 3ix0). Данная модель была выбрана, т.к. она имела наибольшее сходство с нашими аминокислотными последовательностями среди моделей протеаз ВИЧ-1, не связанных с ингибиторами и не имеющих мутации лекарственной устойчивости, а также относилась к наиболее близкому субтипу А.

Для обратной транскриптазы были использованы модель субъединицы p51 обратной транскриптазы ВИЧ-1 (PDB ID: 3kju) и модель обратной транскриптазы/РНКазы Н ВИЧ-1 (PDB ID: 4ic1). Данные модели имеют наибольшее сходство по первичной структуре с нашими последовательностями среди моделей, не находящихся в комплексе с ингибиторами и не имеющих мутаций лекарственной устойчивости.

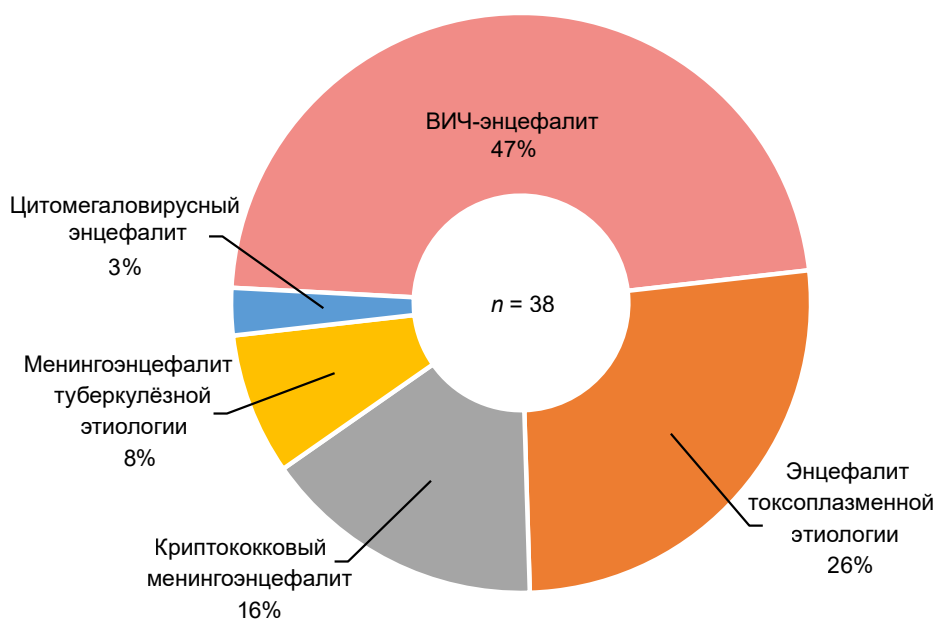
Построение трёхмерных моделей белков и сравнение их структуры проводили с использованием онлайн-сервиса «SWISS-MODEL» [36, 37].

## Результаты и обсуждение

По данным анамнеза пациентов установлено, что продолжительность течения ВИЧ-инфекции с момента установления диагноза до госпитализации составляла в среднем 81 мес ( $\sigma = 64$ ;  $W = 0,924$ ;  $p = 0,01$ ). Большинство пациентов — 30 из 38 (79,0%; 95% ДИ 63,7–88,9) не имели опыта АРТ, остальные находились на терапии по медиане до 29 мес (межквартильный интервал (МКИ) 9–35 мес), но при этом с низкой приверженностью, самостоятельно прерывая назначенные курсы лечения. Учитывая, что все пациенты были госпитализированы на 4В стадии ВИЧ-инфекции, их заражение произошло задолго до установления диагноза. Таким образом, именно многолетнее течение ВИЧ-инфекции без АРТ обусловило поражение ЦНС.

Среди обследованных пациентов ( $n = 38$ ) наиболее часто встречающимися поражениями головного мозга были менингоэнцефалиты и энцефалиты, связанные с оппортунистическими инфекциями и туберкулёзом, — 20 случаев из 38 (52,6%; 95% ДИ 37,3–67,5), среди которых преобладал энцефалит токсоплазменной этиологии — 10 случаев из 20 (50,0%; 95% ДИ 29,9–70,1). ВИЧ-энцефалит был выявлен в 18 случаях из 38 (47,4%; 95% ДИ 32,5–62,7; **рис. 1**).

В нашем исследовании группы пациентов с поражениями головного мозга, вызванными оппортунистическими инфекциями, и группа пациентов с ВИЧ-энцефалитом не имели статистически значимых различий по опыту приёма АРТ, полу, возрасту и другим показателям, что могло быть связано с небольшим объёмом выборки. Ранее проведённые исследования показали, что спектр неврологических заболеваний у пациентов с ВИЧ-инфекцией существенно зависит от доступности терапии и её своевременного начала. В странах, где АРТ широко доступна, неврологические симптомы у пациентов



**Рис. 1.** Структура поражений головного мозга среди обследованных пациентов.

**Fig. 1.** Structure of brain lesions among the examined patients.

с ВИЧ-инфекцией часто обусловлены ВИЧ-энцефалитом. С другой стороны, в развивающихся странах, где доступ к лечению ВИЧ ещё требует улучшения, неврологическое ухудшение часто связано с оппортунистическими инфекциями ЦНС, такими как токсоплазмоз и криптококкоз [38].

Низкое количество CD4 и высокая вирусная нагрузка являются ключевыми факторами, определяющими развитие ВИЧ-энцефалита [39]. Уровень вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови составлял по медиане 4,67 (МКИ 4,19–5,40) Ig копий/мл и статистически значимо превышал аналогичный показатель в ликворе, составляющий по медиане 3,87 (МКИ 2,73–4,66) Ig копий/мл, на 0,8 Ig, или в 6,27 раза ( $U = 442$ ;  $z = 2,904$ ;  $p = 0,004$ ).

Содержание CD4-лимфоцитов в плазме крови составляло по медиане 41,0 (МКИ 21,3–66,5) Ig копий/мл, при этом не имело корреляции с уровнем вирусной нагрузки (**рис. 2**).

Превышение уровня вирусной нагрузки ВИЧ в ликворе по сравнению с плазмой — достаточно распространённое явление среди пациентов, не получающих эффективной АРТ, и среди АРТ-наивных пациентов, что было также показано в перекрёстном многоцентровом исследовании, проведённом в крупных городах Европы в 1982–2017 гг. [40]. При этом различие в уровне вирусной нагрузки составляло 1,0 Ig копий/мл и наблюдалась корреляция между данными показателями в плазме крови и ликворе. В нашем исследовании имелась слабая прямая корреляционная связь между уровнями вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и ликворе: коэффициент Спирмена  $R_s = 0,38$ ,  $p = 0,019$ .

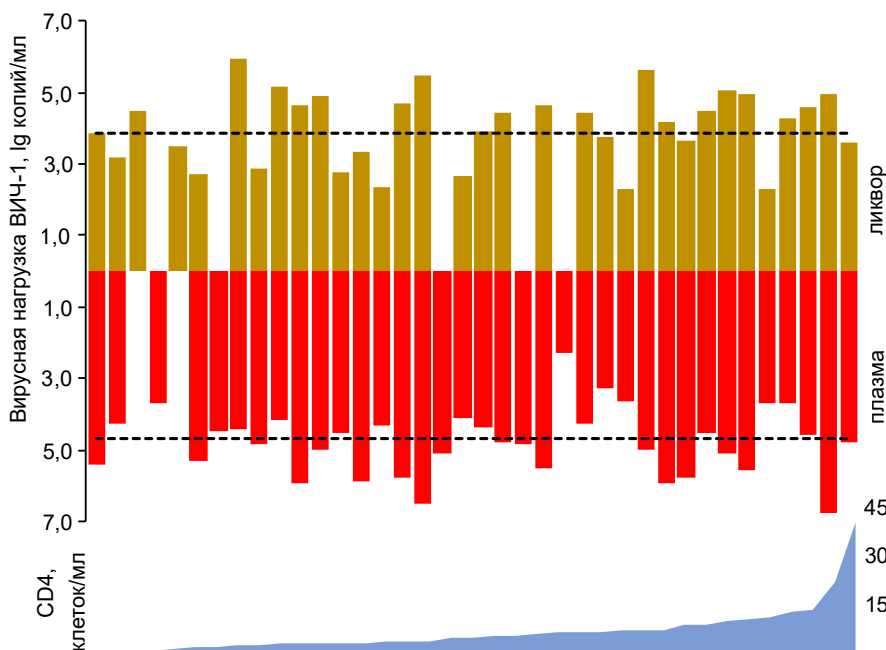
Среди 57 генотипированных образцов от 38 пациентов выявлены 54 представителя субсубтипа А6 (94,7%; 95% ДИ 85,6–98,2), в 2 образцах от 1 пациента выявлен рекомбинантный штамм CRF63\_02A6

(3,5%; 95% ДИ 1,0–11,9) и 1 штамм, выделенный из плазмы, содержал субтип В (1,8%; 95% ДИ 0,3–9,3), притом что штамм, выделенный из ликвора того же пациента, принадлежал к субсубтипу А6 ВИЧ-1.

Для определения филогенетического положения исследуемых штаммов у каждой из 57 последовательностей с помощью сервиса NCBI BLAST найдены геномы ВИЧ, имеющие сходство 95% и выше. После исключения повторяющихся записей, синтетических последовательностей, а также записей, в которых страну происхождения штамма невозможно установить, осталось 2872 нуклеотидных последовательности, имеющие среднюю идентичность по медиане 95,97% (МКИ 95,52–96,51%). Вместе с исследуемыми образцами генотипическая структура была представлена 2508 штаммами субсубтипа А6 (85,5%; 95% ДИ 84,1–86,7), 397 CRF63\_02A6 (13,8%; 95% ДИ 12,6–15,1), 14 субтипов В (0,5%; 95% ДИ 0,3–0,8) и 7 CRF02\_A6G (0,2%; 95% ДИ 0,1–0,5) среди 2929 анализируемых штаммов.

Филогенетический анализ 2929 фрагментов гена *pol* ВИЧ-1, кодирующих протеазу и часть ревертазы, проводили по методу максимального правдоподобия с использованием модели замены нуклеотидов GTR+G и 500 бутстреп-репликациями. В результате сформировались 26 кластеров, в 11 из которых вошли 57 штаммов ВИЧ, выделенных от исследуемых пациентов (**рис. 3**).

Штаммы от пациентов из исследуемой выборки вошли в 11 кластеров. Среди штаммов от пациентов из стран ближнего зарубежья в кластерах с исследуемыми образцами чаще всего оказывались штаммы, циркулирующие на Украине и в Киргизии (по 6 из 11 кластеров), Белоруссии, Таджикистане, Казахстане, Армении (5 из 11 кластеров), среди государств из дальнего зарубежья — в Польше и Германии (5 из 11 кластеров).

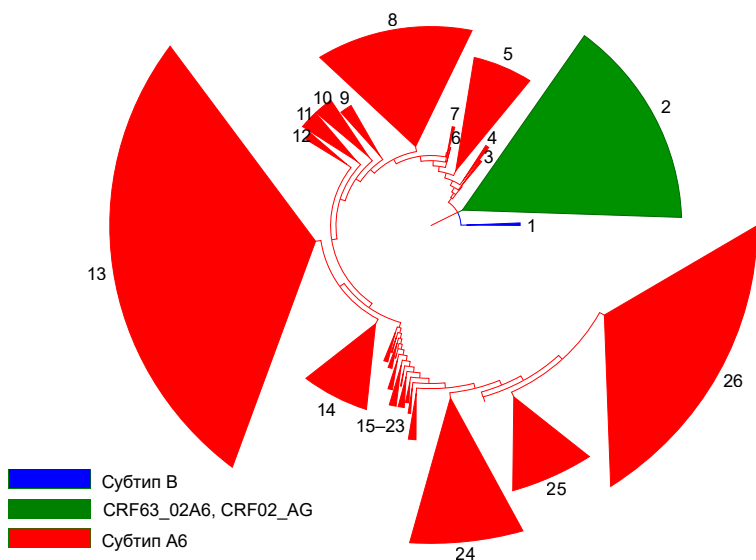


**Рис. 2.** Уровень вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и ликворе и количество CD4-клеток в выборке обследованных пациентов ( $n = 19$ ).

Пунктиром обозначена медиана.

**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.



Номер кластера	Количество изолятов из исследуемой выборки	Прочие изоляты из России	Зарубежные изоляты
1	1	6	8
2	4	399	10
3	11	3	1
4	4	14	0
5	5	110	43
8	9	317	31
11	2	50	4
13	16	649	208
16	1	11	4
22	2	2	3
26	2	241	218

**Рис. 3.** Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе 2929 фрагментов гена *pol* ВИЧ-1 (кодирующих протеазу и часть обратной транскриптазы) с не менее чем 95% сходством со штаммами исследуемой выборки.

**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.

Среди 57 штаммов ВИЧ, выделенных от пациентов из исследуемой выборки, 11 (19,3%; 95% ДИ 11,1–31,3) сформировали отдельный кластер № 3, где на их долю пришлось 73,3% (95% ДИ 48–89,1). Данные штаммы были выделены от 8 пациентов, из которых 6 женщин и 1 мужчина из Челябинска и

1 женщина из города Сатка Челябинской области. Из 8 пациентов только 2 заразились при употреблении наркотиков внутривенно, остальные — половым путём.

Большинство родственных штаммов происходили из России (75,4%; 95% ДИ 73,8–76,9). Их доля

варьировала от кластера к кластеру от 24% (кластер № 23) до 100% (кластер № 15). Наибольший интерес представляли штаммы, происходившие из иностранных государств.

В самом крупном на филогенетическом дереве кластере № 13, содержащем 873 генома ВИЧ (29,8%; 95% ДИ 28,2–31,5), оказались 16 штаммов от пациентов из исследуемой группы, а также штаммы от пациентов из 19 иностранных государств. Наибольшие доли среди 208 штаммов ВИЧ из иностранных государств в данном кластере пришлось на штаммы, циркулирующие в Киргизии (29,3%), Белоруссии (23,6%), Таджикистане (12,0%).

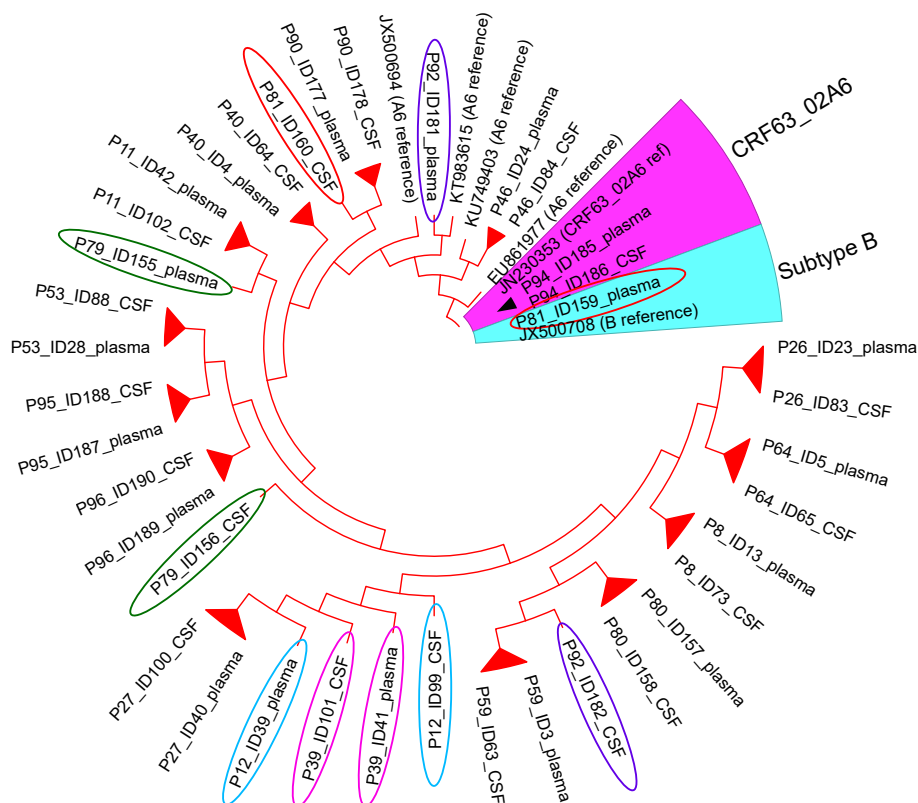
Филогенетический анализ парных образцов из плазмы крови и ликвора от 19 пациентов с референсами субсубтипа А6, субтипа В и CRF63\_02A6 показал, что у 5 пациентов последовательности из плазмы и из ликвора попали в разные кластеры, причём у одного из них штаммы ВИЧ принадлежали к разным субтипам: субтип В — в плазме (ID159, AN: OR260493), субсубтип А6 — в ликворе (ID160, AN: OR260494) (рис. 4).

Из 5 пациентов с генетической неоднородностью геномов ВИЧ из различных компартментов

4 являлись потребителями инъекционных наркотиков. Необходимо отметить, что минимальные различия в геноме штаммов ВИЧ из ликвора и плазмы наблюдались у пациента, не являвшегося потребителем инъекционных наркотиков. На филогенетическом дереве с 2929 геномами ВИЧ штаммы от данных пациентов также оказались в различных кластерах. Существенные различия в геноме ВИЧ, персистирующего по разные стороны ГЭБ, может косвенно свидетельствовать о суперинфицировании пациента, при этом из плазмы крови выделяется штамм, заражение которым произошло позднее.

Для анализа аминокислотных замен (АКЗ) и третичной структуры протеазы и ревертазы ВИЧ были отобраны штаммы из парных проб от 13 пациентов из 19. Из сравнения исключены 5 пациентов с высокой гетерогенностью штаммов и подозрением на суперинфицирование и 1 пациент, у которого в штаммах из плазмы и из ликвора аминокислотный состав протеазы и ревертазы совпал полностью.

Сравнительный анализ выявленных АКЗ в протеазе и ревертазе штаммов из плазмы и ликвора 13 пациентов позволил выявить независимо возникшие мутации, которые сформировались и



**Рис. 4.** Филогенетическое дерево 38 последовательностей гена *pol* ВИЧ-1 от 19 пациентов, полученных парно из плазмы крови и спинномозговой жидкости.

Овалами одного цвета обозначены парные образцы, попавшие в разные кластеры. На ветвях и в кластерах красного цвета размещаются последовательности, принадлежащие к субсубтипу А6 ВИЧ-1.

**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.

закрепились в процессе микроэволюции штаммов ВИЧ, разделённых ГЭБ. Учитывая крайне тяжёлое состояние пациентов, в отдельных случаях могли наблюдаться максимально возможные изменения в геноме, которые успели произойти за время течения ВИЧ-инфекции у одного человека без АРТ.

В протеазе у штаммов ВИЧ, выделенных из плазмы, только в 5 из 13 образцов были выявлены АКЗ, возникшие независимо (присутствовали только у штаммов из одного компартмента и, соответственно, не унаследованные штаммом, персистирующим в ЦНС) от штаммов, выделенных из ликвора, при этом число АКЗ варьировало от 1 до 3. У штаммов, выделенных из ликвора, независимые АКЗ наблюдались также в 5 из 13 образцов, а их количество варьировало от 1 до 2.

В ревертазе у штаммов, выделенных из плазмы, в 10 из 13 образцов были выявлены АКЗ, возникшие независимо от штаммов, выделенных из ликвора, при этом число АКЗ варьировало от 1 до 6. В 12 образцах из ликвора число независимо возникших АКЗ варьировало от 2 до 7.

При сравнении третичной структуры белков, построенных на основе модели субъединицы p51 обратной транскриптазы ВИЧ, выявлены 2 высоко-

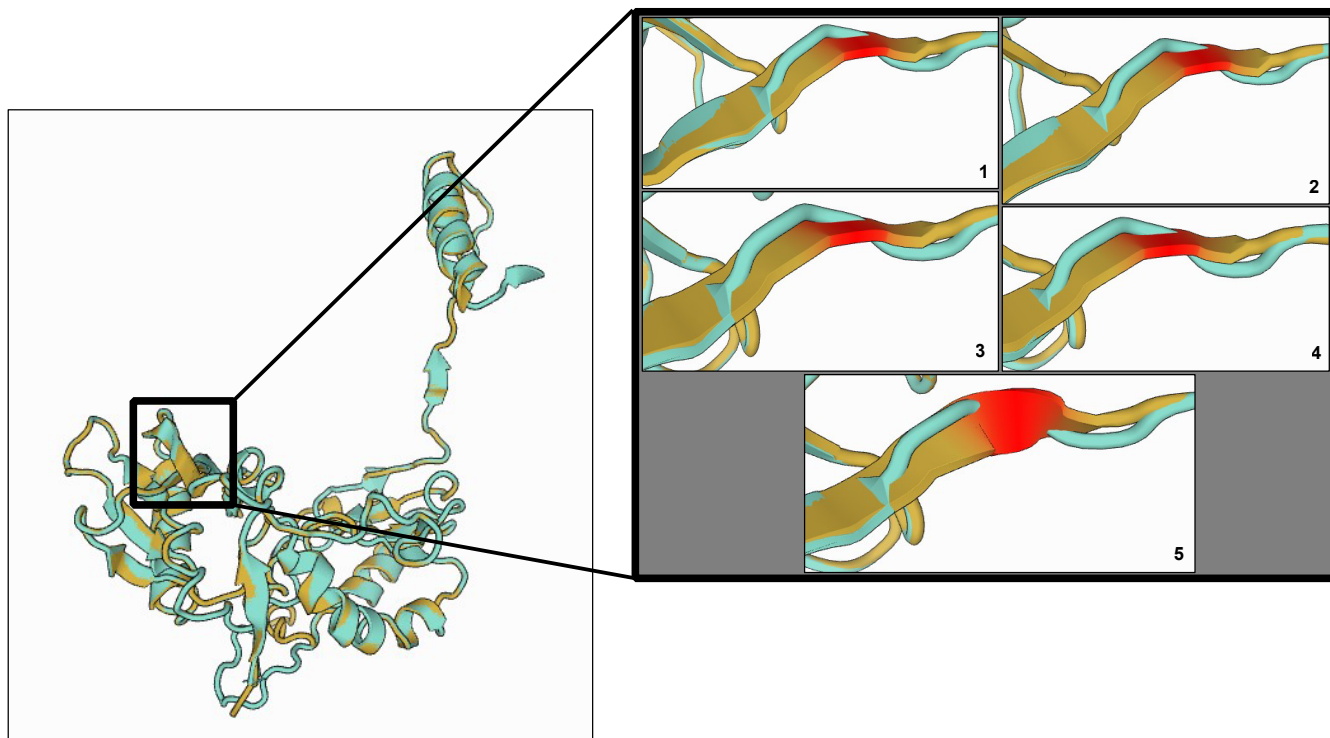
вариабельных участка, имеющих различия между штаммами из плазмы и из ликвора. У штаммов из плазмы и из ликвора от 5 пациентов структуры обратной транскриптазы ВИЧ-1 совпали полностью.

В штаммах из плазмы и из ликвора от других 5 пациентов различия в структуре ревертазы присутствовали в аминокислотных позициях 16–20, что соответствует началу структурного элемента *fingers* (рис. 5).

В конце структурного элемента *palm* в позициях 210–235 также оказался вариабельный участок, различия в котором между штаммами из плазмы и из ликвора были выявлены в 8 парах образцов, включая 5 пар, у которых наблюдалась разница по структуре в позициях 16–20 (рис. 6).

В других исследованиях установлено, что участок в области аминокислотных позиций 219–230, формирующий неупорядоченную петлю в субъединице p51 обратной транскриптазы ВИЧ-1, играет важную роль в процессе димеризации 2 субъединиц фермента [41].

При сравнении третичной структуры субъединицы p66 обратной транскриптазы ВИЧ-1 у 10 из 14 пациентов структуры фермента у штаммов из плазмы и из ликвора совпали полностью, ещё у 3 на-

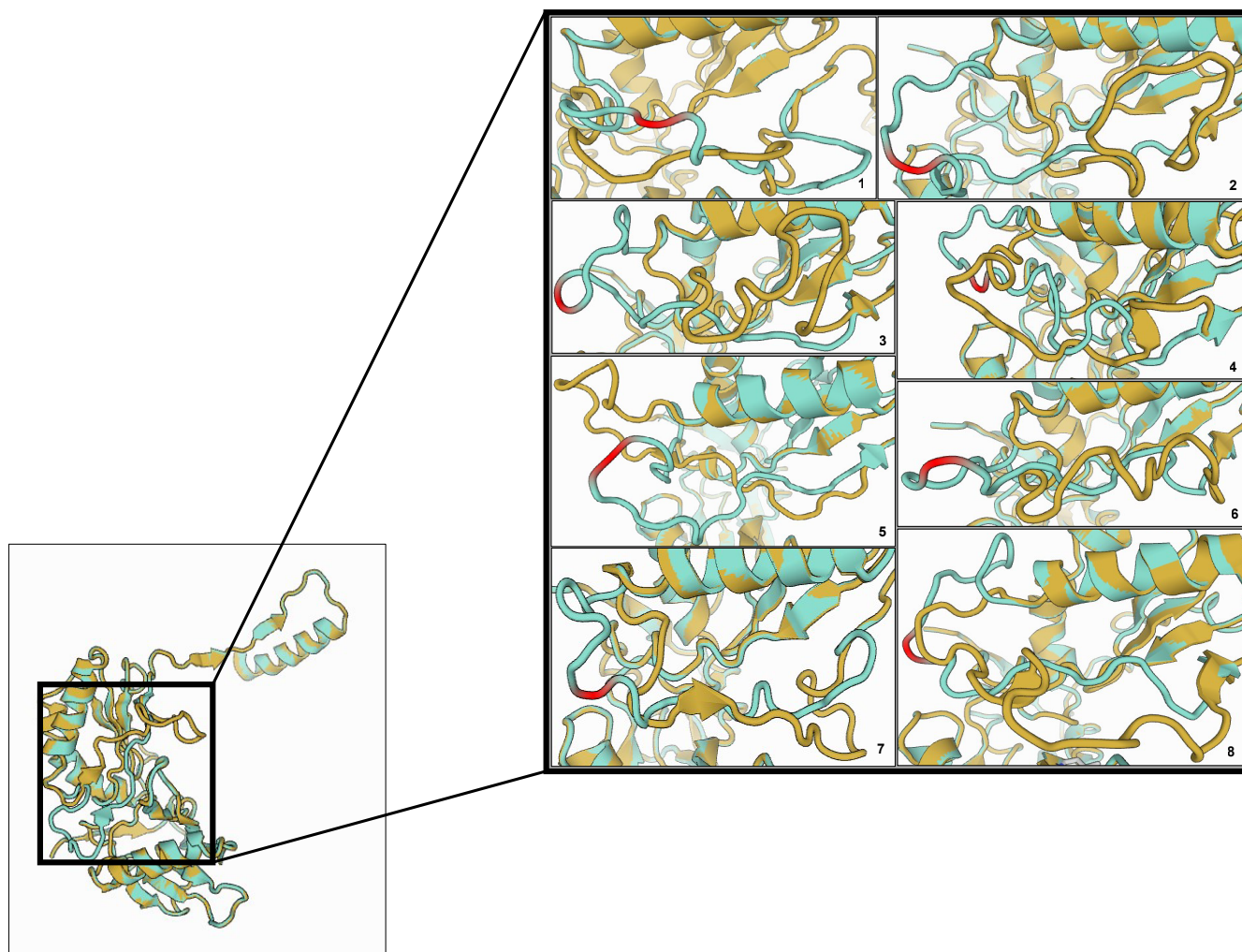


**Рис. 5.** Различия в структуре субъединицы p51 обратной транскриптазы ВИЧ-1 между штаммами из плазмы крови и из ликвора.

Чёрной рамкой крупно выделены аминокислотные позиции 16–20. Салатовым цветом обозначен штамм из плазмы, светло-коричневым — из ликвора. Красным выделена аминокислотная позиция 18.

**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.



**Рис. 6.** Различия в структуре субъединицы р51 обратной транскриптазы ВИЧ-1 между штаммами из плазмы крови и из ликвора.

Чёрной рамкой крупно выделены аминокислотные позиции 210–235. Салатовым цветом обозначен штамм из плазмы, светло-коричневым — из ликвора. Красным выделена аминокислотная позиция 220.

**Fig. 6.** Difference in the tertiary structure of HIV-1 reverse transcriptase p51 subunit between strains from blood plasma and from CSF.

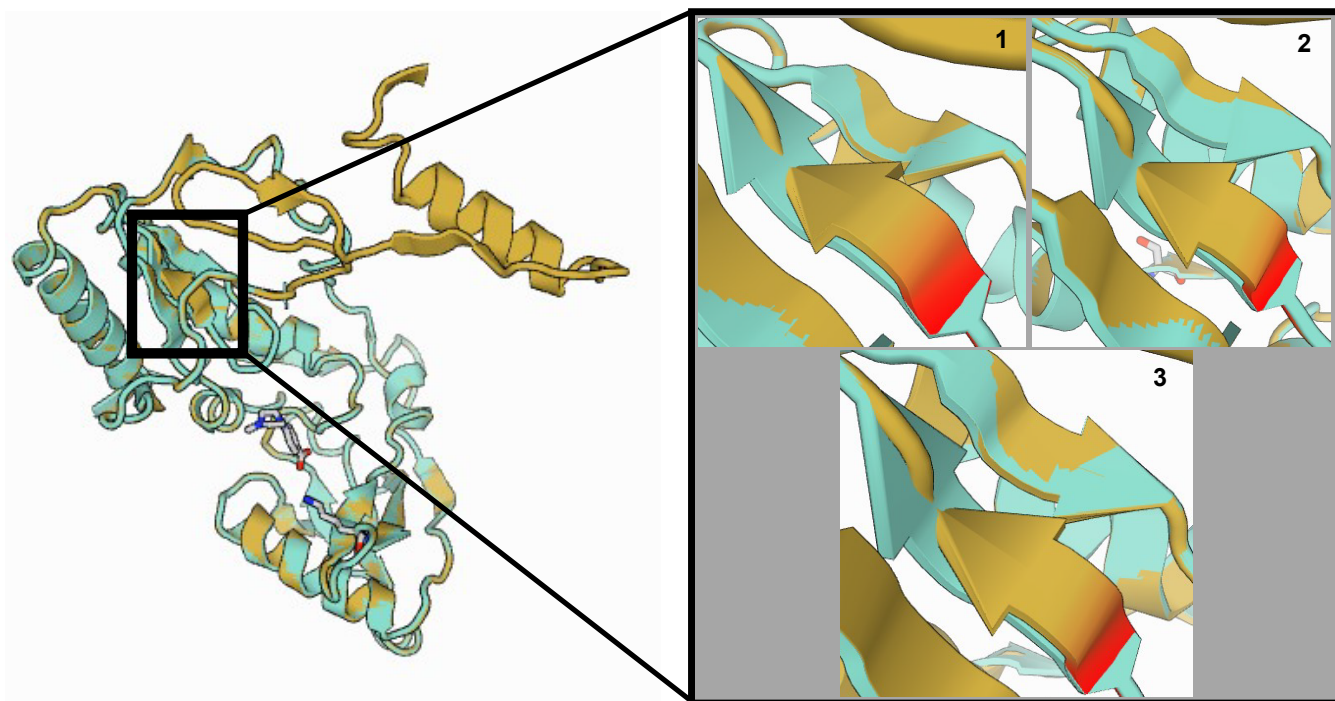
Amino acid positions 210–235 are framed. Strain from blood plasma is shown in cyan, from CSF — in light brown. Amino acid position 220 is highlighted in red.

блюдались закономерно повторяющиеся различия в аминокислотных позициях 187–190 (сразу после каталитически активных позиций 185, 186) (рис. 7).

Данная область входит в участок, являющийся местом связывания нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) с ферментом [42].

В результате даже единичных АКЗ в процессе микроэволюции третичная структура ревертазы изменялась, адаптируясь под специфические условия функционирования. Такая адаптация происходила независимо в разных компартаментах, разделённых ГЭБ. При этом закрепились только те АКЗ, которые наиболее оптимальны для среды функционирования каждого из штаммов ВИЧ. Анализ АКЗ в субъединицах р51 и р66 ревертазы продемонстрировал их связь с различиями в третичной структуре (таблица).

Третичная структура субъединицы р51 обратной транскриптазы ВИЧ-1 оказалась наиболее вариабельной, при этом для возникновения конформационных различий между белками штаммов из плазмы крови и ликвора требовалось не менее 2 эволюционных событий, связанных с АКЗ, по 1 в каждом из штаммов. Субъединица р51 каталитически неактивна и играет лишь структурную роль в комплексе обратной транскрипции. Аналогичные АКЗ в субъединице р66 ревертазы, которая и выполняет каталитические функции, не приводили к изменениям в третичной структуре. В 3 случаях различия в третичной структуре субъединицы р66 присутствовали, но были минимальны и охватывали участок длиной 3 аминокислоты. Различия третичной структуры субъединицы р66 ревертазы



**Рис. 7.** Различия в структуре субъединицы р66 обратной транскриптазы ВИЧ-1 между штаммами из плазмы крови и из ликвора.

Чёрной рамкой крупно выделены аминокислотные позиции 187–190. Салатовым цветом обозначен штамм из плазмы, светло-коричневым — из ликвора. Красным выделена аминокислотная позиция 187.

**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.

были связаны как минимум с 3 эволюционными событиями в одном из штаммов или с 5 событиями в штаммах из ликвора и плазмы.

### Заключение

Выявлена статистически достоверная слабая корреляция между уровнем вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови и ликворе. Показатель вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови превышал значения в ликворе на 0,8 Ig, или в 6,3 раза.

Филогенетический анализ фрагмента гена *pol* ВИЧ-1, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы, демонстрирует высокую степень гетерогенности, часть геномов кластеризуются с близкородственными штаммами, циркулирующими как в странах ближнего зарубежья на Украине и в Киргизии, так и в Центральной Европе: Польше и Германии. Это может свидетельствовать о высокой частоте заносов ВИЧ-инфекции в регион из-за рубежа.

Сравнение участков гена *pol* ВИЧ-1 (кодирующих протеазу и часть обратной транскриптазы) между штаммами из плазмы крови и из ликвора выявило у штаммов от 5 пациентов значительные генетические дистанции между геномами ВИЧ-1 (в 1 случае штаммы принадлежали разным субтипам — А6 в плазме и В в ликворе).

Количество независимых АКЗ в участке, кодирующем вирусную протеазу, у штаммов из плазмы крови составляло от 1 до 3, у штаммов из ликвора — от 1 до 2. Количество АКЗ в участке, кодирующем фрагмент обратной транскриптазы ВИЧ-1, в штаммах из плазмы крови составляло от 1 до 6, а в штаммах из ликвора — от 1 до 7.

Обнаружены высоковариабельные участки в структуре субъединицы р51 обратной транскриптазы ВИЧ-1 в аминокислотных позициях 16–20 и 210–235. У 5 пациентов структура фермента у штаммов из плазмы крови и из ликвора отличалась в обеих позициях, ещё у 4 — только в позициях 210–235. У 3 пациентов третичная структура субъединицы р66 обратной транскриптазы ВИЧ-1 различалась в аминокислотных позициях 187–190. Данная область входит в участок связывания с ННИОТ. Значительно большая разница в третичной структуре наблюдалась в субъединице р51, которая, как известно, не обладает каталитической активностью, однако играет важную структурную роль при формировании комплекса обратной транскрипции.

В третичной структуре вирусной протеазы различий между штаммами из плазмы крови и из ликвора не выявлено.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

АКЗ, связанные с различием в третичной структуре обратной транскриптазы (ОТ) штаммов ВИЧ-1 из ликвора и плазмы крови

Amino acid substitutions, associated with HIV-1 reverse transcriptase (RT) tertiary structure alterations in strains from CSF and blood plasma

ID пациента Patient ID	Номер в GenBank Accession number	Локус Locus	АКЗ относительно референсной последовательности HXB2   Amino acid substitutions relative to HXB2 reference sequence	Различия в третичной структуре субъединицы р51 ОТ в позициях 16–20   Differences in the tertiary structure of RT p51 subunit in positions 16–20	Различия в третичной структуре субъединицы р51 ОТ в позициях 210–235   Differences in the tertiary structure of RT p51 subunit in positions 210–235	Различия в третичной структуре субъединицы р66 ОТ в позициях 187–190   Differences in the tertiary structure of RT p66 subunit in positions 187–190
p8	OR260486	Плазма крови Blood plasma	T69S, Q242K			
	OR260531	Ликвор CSF	E6D, K20E, E28K		+	+
p11	OR260523	Плазма крови Blood plasma	T39D			
	OR260482	Ликвор CSF	T39N	+	+	
p26	OR260512	Плазма крови Blood plasma	–			
	OR260533	Ликвор CSF	E28K, K64R	+	+	
p27	OR260521	Плазма крови Blood plasma	K11A, T39K, V60I			
	OR260480	Ликвор CSF	K11T, E36D, T39E, K64R	+	+	
p53	OR260516	Плазма крови Blood plasma	–			
	OR260535	Ликвор CSF	K64R, A158S		+	
p59	OR260517	Плазма крови Blood plasma	V35K, T39K, I47M			
	OR260528	Ликвор CSF	T39R, K64R, D67N, T200A	+	+	
p95	OR260507	Плазма крови Blood plasma	E40D, D86N, L214F			
	OR260508	Ликвор CSF	–	+	+	+
p96	OR260509	Плазма крови Blood plasma	V35T, T39M, S162H			
	OR260510	Ликвор CSF	V35I, T39K, V60I, S162Y		+	
p46	OR260513	Плазма крови Blood plasma	V35K, F116Y			
	OR260534	Ликвор CSF	T27P, V35T, S162C, D177N			+

АКЗ в обратной транскриптазе ВИЧ-1, приводящие к изменениям в третичной структуре одной субъединицы, не обязательно повлекут изменения в другой.

Описанные наблюдения подтверждают наличие микроэволюционного процесса вируса, проявляющегося в изменениях как первичной, так и тре-

тичной структур ревертазы ВИЧ, идущего параллельно и независимо в организме одного пациента в разных компартаментах, разделённых ГЭБ.

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<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> 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: <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.

#### Информация об авторах

**Питерский Михаил Валерьевич**<sup>✉</sup> — н.с. Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД Федерального научно-исследовательского института вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия, [piterskiy\\_mv@niiviro.ru](mailto:piterskiy_mv@niiviro.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

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**<sup>✉</sup> — researcher, Ural Federal District AIDS Centre, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia, [piterskiy\\_mv@niiviro.ru](mailto:piterskiy_mv@niiviro.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, 1<sup>st</sup> 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

Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-432>



## 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 ЛД<sub>50</sub>. 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 диагностируемый 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>

# Study of the circulation and properties of the West Nile virus in Russia in 2022

Andrey V. Toporkov, Elena V. Putintseva, Svetlana K. Udovichenko<sup>✉</sup>, 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.

**Conclusion.** 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>

## Введение

Широкое территориальное распространение лихорадки Западного Нила (ЛЗН) в России, ежегодная регистрация случаев заболевания, в том числе с возникновением эпидемических вспышек, выявление тяжёлых форм и летальных исходов определяют необходимость постоянного и системного

проведения эпидемиологического надзора за этой инфекцией [1, 2]. Однако наблюдаемые в последние годы существенные снижения объёмов и качества мониторинговых исследований за возбудителем ЛЗН в России затрудняют проведение объективного анализа проявлений ЛЗН и разработку прогноза развития эпидемиологической ситуации. Так, число

обследованных больных, имеющих сходные с ЛЗН симптомы, в 2020 и 2021 гг. сократилось в 5,7 и 4,2 раза относительно показателей 2019 г., а объёмы исследований зооэнтомологического материала — в 2,1 и 1,5 раза соответственно. В этот же период маркеры возбудителя ЛЗН выявлены практически учреждениями Роспотребнадзора только в 3 и 7 субъектах России [3].

С учетом вышеизложенного одной из ключевых задач Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН является проведение активного рекогносцировочного мониторинга за ЛЗН, позволяющего получить достоверные сведения об интенсивности эпизоотического и эпидемического процессов. Проведённые нами в 2020–2021 гг. исследования на фоне низкого уровня официально зарегистрированной заболеваемости ЛЗН в России (в 10 и 6 раз ниже среднееголетнего значения соответственно) подтвердили продолжающийся интенсивный контакт с возбудителем населения Республики Калмыкия, Крым, Адыгея, Краснодарского края, Волгоградской и Астраханской областей [3].

Остро стоит проблема установления ареала ЛЗН в России, что обосновывается подтверждением местных случаев заражения ВЗН только в 26 субъектах, в то время как на большей части территории страны (48 субъектов) получены лишь фрагментарные данные, свидетельствующие о наличии иммунной прослойки к вирусу Западного Нила (ВЗН) среди населения и/или выявления маркеров возбудителя в зооэнтомологическом материале. На территории 11 субъектов циркуляция ВЗН по состоянию на 2022 г. не подтверждена.

Актуальным направлением исследований остаётся изучение популяционной структуры и особенностей распространения различных генетических линий ВЗН в России. Известно, что на территории России подтверждена циркуляция ВЗН генотипов 1, 2 и 4 [1, 4]. Изучение структуры генома возбудителя ЛЗН, циркулирующего в начале 2000-х гг. на юге европейской части страны, юге Западной Сибири и Дальнего Востока, продемонстрировало доминирование ВЗН генотипа 1а [5–7]. В последующем на ряде территорий европейской части России показана циркуляция ВЗН двух эпидемически значимых генотипов — 1а и 2 с преобладанием последнего, а в южных регионах — генотипа 4 [4, 7]. В современный период ввиду снижения объёмов мониторинговых исследований за возбудителем ЛЗН имеются лишь ограниченные данные о циркуляции ВЗН генотипа 2. Вместе с тем обнаружение в 2021 г. ранее не встречавшегося в России геноварианта ВЗН генотипа 2 [3] определяет необходимость усиления системы мониторинга за возбудителем ЛЗН для получения информации о свойствах циркулирующих штаммов, оценки их влияния на клиническую картину забо-

левания и особенности проявлений эпидемического процесса, понимания вероятных путей заноса и распространения вируса.

**Цель работы** — получить объективные данные об интенсивности циркуляции ВЗН на отдельных территориях России и изучить генетическое разнообразие и свойства выделенных штаммов возбудителя.

## Материалы и методы

Активный мониторинг за возбудителем ЛЗН в сезон 2022 г. проводился в 23 субъектах России силами Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (Волгоградский НИПЧИ) во взаимодействии со специалистами Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, научно-исследовательских и противочумных учреждений Роспотребнадзора. Сбор кровососущих членистоногих, отлов мелких млекопитающих и птиц, подготовку проб к исследованию осуществляли в соответствии с СанПиН 3.3686-21, МУ 3.1.3.2600-10 и МР 3.1.0211-20. Членистоногих объединяли в пулы по видам, дате и месту сбора: комаров — от 2 до 30 экземпляров, клещей — от 1 до 7 особей.

Забор проб крови проведён в 11 субъектах РФ в июле–августе 2022 г. от лихорадящих пациентов, проходивших амбулаторное или стационарное лечение по поводу заболеваний, не связанных с ЛЗН (острые респираторные вирусные заболевания, COVID-19, соматические заболевания и др.). В Запорожской области в работе использованы образцы сыворотки крови доноров, полученные из Мелитопольского областного центра крови в октябре 2022 г. Исследование проводили при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ВНИПЧИ (протокол № 3 от 25.04.2022).

Лабораторные исследования проводили на базе ВНИПЧИ, за исключением материала из Запорожской области и Республики Крым, который исследован в лаборатории мобильного комплекса специализированной противэпидемической бригады Роспотребнадзора. Всего исследовано 1547 проб клинического материала и 4564 пробы полевого материала (3181 проба комаров 28 видов, 1 проба кровососущих мошек 1 вида, 2 пробы мух-кровососок 1 вида, 1373 пробы иксодовых клещей 15 видов, 10 проб аргасовых клещей 1 вида, 283 пробы головного мозга птиц 29 видов, 325 проб органов мелких млекопитающих 14 видов).

Скрининг образцов биологического материала на наличие РНК ВЗН проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора), типирование ВЗН — «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» (ВНИПЧИ).

При исследовании сывороток с целью детекции антител к ВЗН классов IgM и IgG использованы коммерческие наборы «ВектоНил-IgG», «ВектоНил-IgM» («Вектор-Бест»). В пробах, положительных на наличие антител класса IgG, определяли индекс avidности с помощью набора «ВектоНил-IgG-avidность» («Вектор-Бест»). В отношении образцов сывороток лиц, проживающих на эндемичных по клещевому вирусному энцефалиту территориях, в случае выявления IgM и/или IgG к ВЗН выполняли парные количественные исследования сывороточных антител к ВЗН и вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) до титров. Определение антител к ВКЭ осуществляли с помощью наборов реагентов «ВектоВКЭ-IgM» и «ВектоВКЭ-IgG» («Вектор-Бест»). В случаях существенного превышения концентрации сывороточных антител к ВЗН по сравнению с ВКЭ или отсутствия антител к ВКЭ принимали решение в пользу специфичности выявляемых антител к ВЗН.

В качестве источников информации о количестве зарегистрированных случаев заболевания ЛЗН использовали формы статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» в Российской Федерации за 2009–2022 гг., об уровне иммунной прослойки к ВЗН среди населения обследованных территорий — отчётные данные, представленные Управлениями Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации в референс-центр, и материалы научных публикаций.

Изоляцию вируса осуществляли согласно классическому протоколу заражением монослоя клеточной линии Vero супернатантом проб биологического материала, в которых обнаружена РНК ВЗН [8]. Для достижения достаточной инфекционной активности каждый изолят трёхкратно пассировали на культуре клеточной линии Vero. Изучение патогенных свойств проводили в отношении 22 штаммов ВЗН, выделенных в период с 2018 по 2022 г. из проб полевого материала и хранившихся в рабочей коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (табл. 1). С целью изучения патогенных свойств указанных штаммов беспородным белым мышам вводили внутримышечно по 100 мкл десятикратно раститрованного вируссодержащего материала. В течение 21 дня после заражения наблюдали за состоянием животных и фиксировали их гибель. ЛД<sub>50</sub> рассчитывали, используя формулу Кербера в модификации Ашмарина. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Манна–Уитни.

Выделение тотальной РНК из инактивированного фильтрованного супернатанта линии клеток Vero осуществляли с помощью набора «RNeasy Mini Kit, RNeasy Mini Spin Columns» («Qiagen»). Подготовку библиотек для секвенирования прово-

дили в соответствии с методикой, предложенной L.A. Moser и соавт. [9]. Секвенирование выполняли на платформе «Illumina MiSeq» («Illumina corp.») с помощью набора «MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)» («Illumina corp.»). Сборку последовательностей *de novo* и на референсный геном ВЗН (GenBank accs. NC\_001563.2) осуществляли с помощью программных продуктов Cutadapt 2.9, Samtools 1.9, Bcftools 1.9, bwa 0.7.17-r1188 и SPAdes v3.15.1, объединённых в конвейеры при помощи собственных скриптов, реализованных на языке Python 3. Нуклеотидные последовательности полных геномов изолятов ВЗН с выявленным потенциальным сайтом гликолизирования в положении N1433 белка NS2B депонировали в международную базу данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под регистрационными номерами OP345101, OP345085, OP345086, OP345087, OP345088, OP345089, OP345090, OP345091, OP345092, OP345093, OP345094, OP345098, OP345099, OP345100, OR159869, OQ214888, OR159871, OR159873, OQ214890, OR159872, OQ214891.

## Результаты

При исследовании 1331 пробы сывороток крови от лихорадящих больных в 20 (1,5%) случаях обнаружены антитела класса IgM к ВЗН (табл. 2). На основании клинической картины заболевания и результатов лабораторного исследования всем пациентам, сыворотки крови которых содержали IgM-антитела к ВЗН, свидетельствующие об острой фазе инфекционного процесса, медицинскими специалистами выставлен диагноз ЛЗН. РНК ВЗН в исследуемых пробах не обнаружена.

В Карачаево-Черкесской Республике, Владимирской и Тверской областях местные случаи заболевания ЛЗН зарегистрированы впервые, что позволяет говорить об установленном расширении ареала этой инфекции.

Исследования, проведённые специалистами референс-центра, подтвердили инфицирование ВЗН человека в Тамбовской области (табл. 2), где первый местный случай ЛЗН выявлен специалистами медицинской организации в апреле 2022 г.

В остальных субъектах России заболеваемость была официально зарегистрирована ранее. Проявления ЛЗН носили вспышечный характер только на территории Липецкой области (2012 г. — 35 больных) с последующей регистрацией спорадических случаев в 2013 г. (4), 2015, 2017, 2021 гг. (по 1), 2016 г. (3), 2019 г. (6) [10]. В Ульяновской области до 2022 г. случаи ЛЗН выявлены в 2009 г. (1 больной), 2012 г. (4); в Белгородской — в 2012 г. (5), 2013 г. (2), 2014 г. (1); в Курской — в 2012 г. (1) и в 2019 г. (4); в Тульской — в 2021 г. (1); в Самарской — в 2012–2014 гг. (по 9), 2015 г. (4), 2016–2017 гг. (по 3), 2019 г. (2); в Запорожской — в 2009 г. (11), 2011 г.

**Таблица 1.** Штаммы ВЗН коллекции ВНИПЧИ, используемые в работе**Table 1.** West Nile virus strains from the collection of the Volgograd Anti-Plague Scientific Research Institute, used in the study

№ No.	Название штамма   Strain name		Источник выделения Selection source	Место отлова переносчика/хозяина Location of vector/host
	Коллекция ВНИПЧИ Роспотребнадзора collection of the Volgograd Plague Control Research Institute	Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Department of collection of microorganisms, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR		
1	Volg601/18	V-959	<i>Culex modestus</i>	Волгоградская область Volgograd Region
2	Volg696/18	V-960	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область Volgograd Region
3	Volg723/18	V-961	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область Volgograd Region
4	Volg774/18	–	<i>Culex spp.</i>	Волгоградская область Volgograd Region
5	Volg829/18	V-962	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область Volgograd Region
6	Volg840/21	V-1203	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область Volgograd Region
7	Voronezh796/21	–	<i>Culex pipiens</i>	Воронежская область Voronezh Region
8	Volg701/21	V-1202	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область Volgograd Region
9	Astrahan962/21	–	<i>Culex modestus</i>	Астраханская область Astrakhan Region
10	Rostov 362/21	–	<i>Corvus frugilegus</i>	Ростовская область Rostov Region
11	Krim221/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Республика Крым Republic of Crimea
12	Krim233/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Республика Крым Republic of Crimea
13	Krim245/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Республика Крым Republic of Crimea
14	Klmk499/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Республика Калмыкия Republic of Kalmykia
15	Klmk 502/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Республика Калмыкия Republic of Kalmykia
16	Volg 565/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область Volgograd Region
17	KCHR755/22	–	<i>Culex modestus</i>	Карачаево-Черкесская Республика Karachay-Cherkess Republic
18	Volg 912/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область Volgograd Region
19	Volg 911/22	V-1388	<i>Culex modestus</i>	Волгоградская область Volgograd Region
20	Stavropol1516/22	–	<i>Culex pipiens</i>	Ставропольский край Stavropol Territory
21	Stavropol1451/22	V-1389	<i>Culex pipiens</i>	Ставропольский край Stavropol Territory
22	Astrahan1031 /22	–	<i>Culex pipiens</i>	Астраханская область Astrakhan Region

**Таблица 2.** Суммарные результаты обследования населения отдельных территорий европейской части России на наличие антител к ВЗН

**Table 2.** The total results of serosurvey for the antibodies to WNV in certain territories of European part of Russia

№ No.	Название субъекта Name of the constituent entity	Количество проб Number of samples	Выявлены антитела к ВЗН   Detection of antibodies to WNV					
			IgM		IgG		низкоавидные IgG   low avidity IgG	
			n	%	n	%	n	%
1	Карачаево-Черкесская Республика Karachay-Cherkess Republic	105	1	0,9	6	5,7	0	0
2	Тульская область Tula Region	104	0	0	16	15,4	4	3,8
3	Ульяновская область Ulyanovsk Region	146	2	1,4	5	3,4	2	1,4
4	Тверская область Tver Region	100	7	7,0	3	3,0	1	1
5	Самарская область Samara Region	101	0	0	6	6,0	1	1
6	Тамбовская область Tambov Region	108	4	3,7	1	0,9	0	0
7	Курская область Kursk Region	117	2	1,7	13	11,1	6	5,1
8	Ставропольский край Stavropol Territory	239	3	1,3	12	5,0	5	2,1
9	Владимирская область Vladimir Region	54	1	1,8	0	0	0	0
10	Белгородская область Belgorod Region	154	0	0	13	8,4	1	0,6
11	Липецкая область Lipetsk Region	103	0	0	5	4,9	1	1
12	Запорожская область Zaporozhye Region	216	–	–	53	24,5	23	10,6
Итого   Total		1547	20	1,5	133	8,6	44	2,8

**Примечание.** Прочерк — исследования не проводились.

**Note.** The dash means no studies have been conducted.

(5), 2012 г. (10), 2018 г. (8), 2019 г. (4); в Ставропольском крае — в 2012 г. (2), 2018 г. (2) и 2019 г. (4) [11].

Наличие иммунной прослойки к ВЗН установлено в среднем у 8,6% населения, проживающего на территории 11 субъектов (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о продолжающемся контакте населения с возбудителем ЛЗН и необходимости усиления мероприятий эпидемиологического надзора.

При сопоставлении результатов наших исследований со средним уровнем иммунной прослойки к ВЗН среди населения обследованных субъектов за 2009–2022 гг. установлены сходные значения серопревалентности в Ставропольском крае (5,9%), Белгородской (8,1%), Липецкой (3%), Ульяновской (2,9%), Самарской (3,9%) областях. Обращает на себя внимание высокий процент положительных находок на наличие антител к ВЗН класса IgG в Тульской (15,4%) и Курской (11,1%) областях, на территории которых выявлены единичные больные ЛЗН. Что касается Тверской области, то наличие антител

к ВЗН у местного населения при плановом мониторинге выявлено здесь однократно в 2014 г. (1,3%), в Тамбовской — в 2012 г. (2,6%), во Владимирской — 2016 г. (3%). Официальные отчетные данные по иммунной прослойке к ВЗН среди населения Карачаево-Черкесской Республики и Запорожской области отсутствовали.

В пробах, положительных на наличие антител класса IgG, определена авидность с целью установления давности контакта с возбудителем. Установлено, что 44 пробы сыворотки крови от населения 9 субъектов содержали низкоавидные IgG-антитела, свидетельствующие об инфицировании ВЗН в предшествующие 2–3 мес.

Циркуляция ВЗН в эпизоотическом цикле в 2022 г. на юге европейской части России подтверждена на всех обследованных территориях, за исключением Республики Адыгея (табл. 3). Высокий удельный вес положительных находок среди кровососущих комаров установлен в Ставропольском крае (8,2%), Волгоградской области (5,9%) и



**Таблица 3.** Объёмы и результаты лабораторных исследований на наличие РНК ВЗН энтомологического материала  
**Table 3.** The volumes and results of laboratory tests for WNV RNA presence in entomological material

№ No.	Название субъекта Name of the constituent entity	Комары   Mosquitoes			Клещи   Ticks		
		коли- чество пулов number of pools	количество положительных пулов, % number of positive pools, %	структура положительных находок structure of positive pools	коли- чество пулов number of pools	количество положительных пулов, % number of positive pools, %	структура положитель- ных находок structure of positive pools
1	Волгоградская область 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	Астраханская область Astrakhan Region	338	1 (0,3)	1 — <i>Cx. pipiens</i>	124	4 (3,2)	4 — <i>H. marginatum</i>
3	Ростовская область Rostov Region	27	1 (3,7)	1 — <i>Ae. caspius</i>	21	1 (4,8)	1 — <i>Ixodes ricinus</i>
4	Запорожская область Zaporozhye Region	203	6 (3)	6 — <i>Cx. pipiens</i>	192	0	—
5	Республика Крым Republic of Crimea	693	14 (2)	9 — <i>Ae. caspius</i> , 4 — <i>Cx. modestus</i> , 1 — <i>Cx. pipiens</i>	—	—	—
6	Республика Калмыкия Republic of Kalmykia	174	4 (2,3)	4 — <i>Cx. pipiens</i>	95	0	—
7	Республика Адыгея Republic of Adygea	91	0	—	57	0	—
8	Карачаево-Черкесская Республика Karachay-Cherkess Republic	78	3 (3,8)	2 — <i>Cx. modestus</i> , 1 — <i>Cx. pipiens</i>	7	0	—
9	Ставропольский край Stavropol Territory	110	9 (8,2)	9 — <i>Cx. pipiens</i>	99	0	—
10	Белгородская область Belgorod Region	18	0	—	0	0	—
11	Курская область Kursk Region	166	0	—	59	0	—
12	Липецкая область Lipetsk Region	315	0	—	61	0	—
13	Тамбовская область Tambov Region	20	0	—	11	0	—
14	Тверская область Tver Region	11	0	—	23	0	—
15	Тульская область Tula Region	142	1 (0,7)	1 — <i>Coquillettidia richiardii</i>	5	0	—
16	Владимирская область Vladimir Region	40	0	—	57	0	—
17	Самарская область Samara Region	171	0	—	36	0	—
18	Ульяновская область Ulyanovsk Region	110	0	—	0	0	—
19	Кемеровская область Kemerovo Region	0	0	—	16	0	—
20	Новосибирская область Novosibirsk Region	0	0	—	36	0	—
21	Омская область Omsk region	0	0	—	12	0	—
22	Ханты-Мансийский АО Khanty-Mansi Autonomous District	0	0	—	28	0	—
23	Тюменская область Tyumen region	0	0	—	72	0	—
Итого   Total		3181	67	—	1383	6	—

Карачаево-Черкесской Республике (3,8%), что свидетельствовало о наличии здесь значительного эпидемиологического риска для населения.

В наиболее старом очаге ЛЗН — Астраханской области — при низком проценте ПЦР-положительных проб кровососущих комаров (0,3%) установлен высокий удельный вес положительных находок (3,2%) в пробах иксодовых клещей. Выявляемость ВЗН среди иксодовых клещей вида *H. marginatum*, снятых с крупного рогатого скота, составила 16% (4 из 25 проб).

В Волгоградской области выявляемость маркеров ВЗН в комарах в 2022 г. была сопоставима с показателями предыдущих лет. Однако, впервые за многолетний период исследований Референс-центра, 78,6% всех положительных находок в Волгоградской области пришлось на комаров видов *Ae. vexans* и *Ae. caspius*, собранных в конце июня, что подтверждало активный эпизоотический процесс и рассматривалось нами как предвестник возможного эпидемиологического неблагополучия.

Выявляемость маркеров ВЗН кровососущих комаров в 2022 г. в Республике Калмыкия составила 2,3%. При практически ежегодно отмечаемых на этой территории признаках активности эпизоотического процесса официально заболеваемость здесь не регистрируется с 2013 г. Малоизученным остаётся видовой состав комаров — потенциальных переносчиков ВЗН в Республике Калмыкия. В 2022 г. по результатам энтомологического обследования специалистами Референс-центра удалось дополнить видовой состав комаров видами *Anopheles algeriensis* и *Coq. richardii*.

В Республике Адыгея в 2022 г. заражённость ВЗН носителей и переносчиков не установлена. В отличие от других субъектов юга России, в которых высокая численность комаров вида *Cx. pipiens* поддерживается за счёт наличия на приусадебных участках запасов воды в искусственных ёмкостях, в Адыгее в связи с высоким уровнем увлажнения подобные места выплода практически отсутствуют. Здесь также не выявлен один из компетентных переносчиков ВЗН — *Cx. modestus*. Однако в Республике Адыгея нами обнаружен комар вида *Ae. koreicus* (г. Майкоп), присутствие которого на этой территории не описано в доступных публикациях.

В Республике Крым доля положительных на наличие РНК ВЗН проб комаров составила 2%, в урбанизированных биотопах данный показатель был существенно выше и достиг 4,1%. Большинство положительных находок пришлось на комаров вида *Ae. caspius*, который являлся общим эудоминантным видом в урбанизированных и загородных биотопах. Все находки в 2022 г. обнаружены в пробах переносчиков, отловленных на севере Крыма (Краснопереконский район), где ранее циркуляция ВЗН не была установлена.

Из субъектов центра европейской части России и Западной Сибири маркеры возбудителя ЛЗН в зооэнтомологическом материале обнаружены только на территории Тульской области (табл. 3).

Суммируя данные исследований полевого материала молекулярно-генетическим методом, отметим, что в пробах переносчиков РНК ВЗН выявлена преимущественно в низкой концентрации. В 43 (79,6%) из 54 проб значение порогового цикла (threshold cycle, Ct) превышало 28 и свидетельствовало о преобладании среди инфицированных комаров и клещей относительно низкого уровня вирусной нагрузки. Высокая концентрация РНК ВЗН (значения Ct: 8,98; 10,2; 14,55; 15,55; 15,77) выявлена только в 5 пробах переносчиков (4 пробах *Cx. pipiens* и 1 пробе *H. marginatum*).

По результатам типирования положительных проб установлена принадлежность выделенных фрагментов РНК ВЗН к генотипу 2 в 27 (50%) из 54 образцов: в пробах комаров *Cx. pipiens*, отловленных в Республике Калмыкия, Астраханской области и Ставропольском крае; комаров *Cx. pipiens*, *An. hyrcanus*, *Cx. modestus*, *Ae. vexans*, *Ae. caspius* — в Волгоградской области; комаров *Ae. caspius* и клещей *I. ricinus* — в Ростовской области. Генотипы 1 и 4 ВЗН в пробах не установлены.

Проведение генотипирования проб, в которых концентрация РНК ВЗН была ниже предела чувствительности набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» ( $1 \times 10^4$  копий/мл), было затруднено. При исследовании проб со значением Ct  $\geq 30$  определить генотип удалось в 6 (21,4%) из 28 проб, Ct = 28–30 — 66,7%, в то время как со значениями Ct < 28 — в 100% исследуемых проб.

Учитывая низкую концентрацию возбудителя в нативном материале, с целью получения изолятов ВЗН и изучения их биологических и молекулярно-генетических свойств проводили накопленные вируса на культуре клеток. В 2022 г. получено 12 изолятов ВЗН: 3 — из Республики Крым, 2 — из Республики Калмыкия, 1 — из Карачаево-Черкесской Республики, 3 — из Волгоградской области, 1 — из Астраханской области, 2 — из Ставропольского края.

Для штаммов ВЗН, выделенных в 2022 г., нами установлены особенности течения инфекции у беспородных белых мышей с определением инкубационного периода заболевания и рассчитана ЛД<sub>50</sub>. В результате заражения лабораторных мышей, независимо от используемого штамма ВЗН, выделенного в 2022 г., у животных развивалась только гриппоподобная форма заболевания и отмечались следующие симптомы: мокрый мех, адинамия, озноб, сонливость. В отличие от этого у 20% мышей, заражённых штаммами 2018 и 2021 гг., заболевание протекало с признаками поражения нервной системы в виде монопарезов и серозного менингита [12].

Гибель животных в среднем наблюдалась с 10-х по 14-е сутки, что при сравнении с данными, полученными для штаммов, выделенных в 2018 г. и 2021 г. (3–14-е и 6–14-е сутки соответственно), предполагает тенденцию к увеличению сроков инкубационного периода. Среднее значение ЛД<sub>50</sub> штаммов 2022 г. составило 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> БОЕ, в то время как ЛД<sub>50</sub> штаммов 2018 и 2021 гг. — 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> БОЕ. Летальность для штаммов 2022 г. в среднем была равна 22% и имела статистически достоверные отличия от аналогичных показателей для штаммов 2018 (60%) и 2021 гг. (40%) при уровне значимости  $p = 0,05$ . Однако при заражении штаммами из Астраханской области и Ставропольского края летальность составила 57% и была сопоставима с ранее изолированными штаммами.

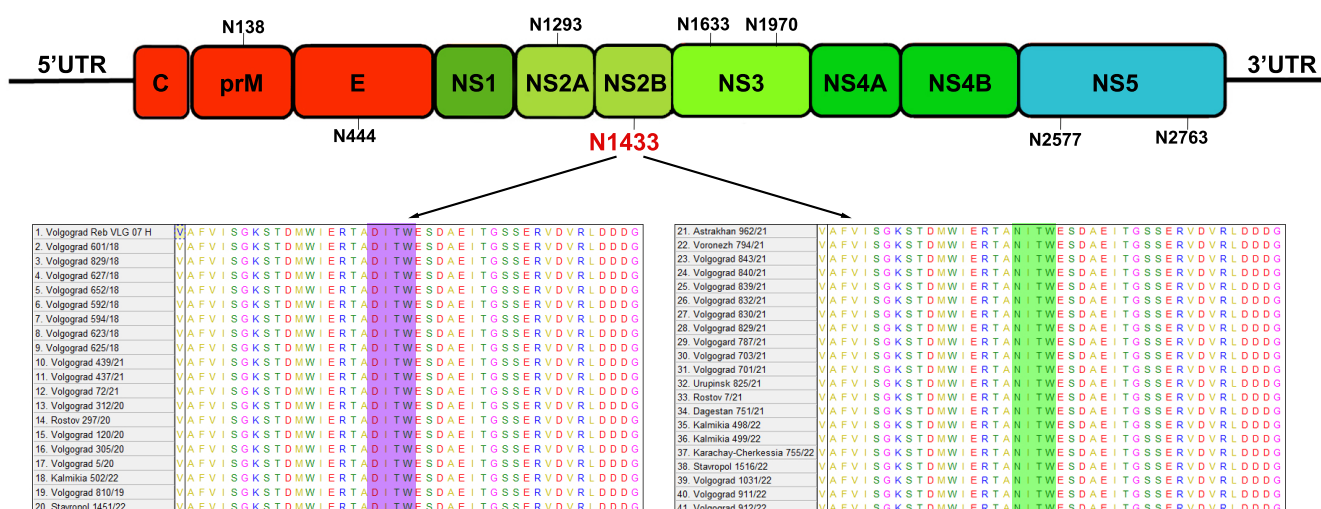
Сравнительный анализ полногеномных последовательностей 12 изолятов ВЗН показал, что 2 из них, выделенные на территории Республики Калмыкия и в Ставропольском крае в 2022 г., формируют новую обособленную кладу. Топология филогенетического дерева указывает на возможное африканское происхождение ВЗН. Вероятно, на территорию России данный геновариант был занесён перелётными птицами. Оставшиеся 10 изолятов принадлежали к кладе вируса, сформированной в 2021 г. изолятами, выделенными в Волгоградской, Астраханской, Ростовской, Воронежской областях и Республике Дагестан. Примечательно, что в 2022 г. на территории Республики Калмыкия и Ставропольского края выявлена одновременная циркуляция изолятов как клады ВЗН генотипа 2,

сформированной в 2021 г., так и изолятов нового геноварианта.

Проанализированы 44 аминокислотные полные кодирующие последовательности изолятов ВЗН, выделенных в 2018–2022 гг. в России, и проведён сравнительный анализ с референсом генотипа 2 NC\_001563, а также с изолятами, циркулирующими на территории Европы. Нами выявлен ряд сайтов гликозилирования, являющихся общими для изолятов ВЗН, циркулирующих на территории России и стран европейского региона. Известно, что сайты гликозилирования играют ключевую роль во взаимодействии вируса с клетками хозяина и являются так называемыми горячими точками в адаптационной изменчивости ВЗН. Также впервые выявлен потенциальный сайт гликозилирования в положении N1433 белка NS2B у ряда изолятов, выделенных в 2021 и 2022 гг. в России (**рисунок**). Интересен тот факт, что данная мутация отсутствует как у референса генотипа 2, так и у изолятов из стран Европы. Проведённое исследование не показало территориальной приуроченности изолятов, обладающих данным сайтом гликозилирования, к конкретным территориям либо к известным на сегодняшний день геновариантам генотипа 2 ВЗН.

## Обсуждение

Лабораторно подтверждённые случаи ЛЗН в Тверской и Владимирской областях являются первыми доказательствами местной передачи ВЗН на этих территориях. Нельзя исключать, что случаи заболевания среди населения здесь могли происходить



Результаты анализа сайтов гликозилирования геновариантов ВЗН, циркулирующих на территории России.

Координатами на карте генома ВЗН обозначены сайты гликозилирования, выявленные при помощи NetNGlyc-1.0. Зелёным цветом обозначен сайт гликозилирования у ряда изолятов, выявленных в период с 2021 по 2022 г. Фиолетовым цветом выделена последовательность белка NS2B изолятов, у которых данный сайт гликозилирования отсутствовал.

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.

в более ранний период, но не были диагностированы медицинскими специалистами, поскольку в этих субъектах на наличие маркеров ЛЗН обследованы единичные больные. В пользу нашего предположения могут свидетельствовать данные по обнаружению иммунной прослойки к ВЗН среди жителей Владимирской области (3% в 2015 г.), а также подтверждение в 2021 г. местных случаев в Московской области [13]. В Тверской области по результатам предыдущих сероэпидемиологических исследований (2013 г.) получены отрицательные результаты [14].

На территории Карачаево-Черкесской Республики до 2022 г. циркуляция ВЗН не установлена, что, вероятно, обусловлено отсутствием комплексного мониторинга за возбудителем ЛЗН. При этом заболеваемость, в том числе вспышечного характера, подтверждена на сопредельных территориях — в Краснодарском и Ставропольском краях. Суммируя наши данные по выявлению местного случая заболевания, заражённым ВЗН переносчикам и иммунной прослойке среди населения, можно доказать эндемичность территории Карачаево-Черкесской Республики по ЛЗН.

Отрицательные результаты на наличие РНК ВЗН проб клинического материала, по всей видимости, связаны со взятием материала на исследование в поздние сроки от начала заболевания, когда концентрация вируса в крови резко снижается. По данным, представленным Управлениями Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации в Референс-центр, средний срок взятия материала на исследование от начала появления клинических симптомов составил 6 дней, максимальный — 14 дней. О непродолжительной вирусемии можно сделать вывод исходя из течения заболевания, которое у 85% пациентов протекало в лёгкой форме и характеризовалось кратковременной лихорадкой.

Значения серопревалентности к ВЗН, полученные Референс-центром в Ульяновской, Липецкой, Белгородской, Самарской областях, Ставропольском крае, в целом сопоставимы с показателями, выявленными при плановом серологическом мониторинге. В Курской области уровень иммунной прослойки к ВЗН был существенно выше показателей, установленных в 2017–2021 гг. при проведении серологического мониторинга учреждениями Роспотребнадзора (0,5–1,3%). Аналогичная закономерность отмечена и для Тульской области, где при обследованиях выборочных групп здорового населения в отдельные годы получены отрицательные результаты. Однако, по данным научных публикаций, здесь подтверждена этиологическая роль ВЗН у 4 лихорадящих больных, госпитализированных в медицинские организации Тулы ещё летом 2012 г., а антитела класса IgG выявлены у 1,5% обследованных [15]. Таким образом, установленная нами серопревалентность населения этих территорий может

характеризовать высокую степень и частоту его контакта с возбудителем ЛЗН в сезон 2022 г.

Интересно отметить, что уровень популяционного иммунитета к ВЗН в Запорожской области был сопоставим с показателями, полученными на территориях России с высокой эпидемической опасностью, такими как Волгоградская, Ростовская, Астраханская области. До настоящего времени данные о распространении ЛЗН в Запорожской области были ограничены. В доступных источниках имеются сообщения о выявлении спорадических случаев заболеваний ЛЗН, а сведения о состоянии иммунной прослойки населения к возбудителю ЛЗН в современный период отсутствуют.

Интенсивность эпизоотического процесса практически на всех обследованных территориях юга европейской части России не соответствовала количеству официально зарегистрированных случаев заболевания, которое не превышало 1–3 больных ЛЗН в субъекте. По всей видимости, данное наблюдение может быть связано со снижением эффективности выявления больных ЛЗН специалистами медицинских организаций. Совокупное количество обследованных в 2022 г. больных с симптомами, сходными с ЛЗН, на территориях юга европейской части России составило 542 человека, что в 2,8 раза ниже среднееголетнего значения (1516 человек). При этом в отдельных субъектах юга России (Ставропольский край, Карачаево-Черкесская Республика) в 2022 г. активное выявление больных ЛЗН медицинскими специалистами не осуществлялось.

Высокая доля ПЦР-положительных проб среди иксодовых клещей *H. marginatum* на территории Астраханской области в нашем исследовании и данные научных публикаций о заражённости ВЗН 2,6% *H. marginatum*, собранных с крупного рогатого скота в средней дельте Волги, а также выявления РНК ВЗН у голодных имаго, собранных в начале весны, позволяют сделать вывод об их значимом участии в эпизоотическом процессе и сохранении возбудителя в межэпизоотический период [16]. Роль данного вида клещей в эпидемическом процессе не изучена, и это представляется актуальным направлением научных исследований.

Высокий удельный вес положительных находок среди комаров рода *Aedes* свидетельствует об их важной роли не только в течении эпизоотического процесса ЛЗН, но и, возможно, инфицировании ВЗН человека. Однако для понимания эпидемиологической значимости комаров рода *Aedes* или другого рода необходимы комплексные исследования, направленные на изучение их векторной компетентности, а также взаимосвязи между динамикой численности переносчиков и заболеваемостью населения в сезон передачи ВЗН.

Факт обнаружения азиатского вида *Ae. koreicus* в Адыгее укладывается в общую тенденцию рас-

ширения ареала этого вида переносчика, наблюдаемую в последние годы на юге России. Присутствие *Ae. koreicus* установлено в 2013 и 2018 гг. в Краснодарском крае, в 2018 г. — в Республике Крым [17, 18]. Компетентность данного вида в отношении ВЗН в России не исследована.

Низкая выявляемость маркеров ВЗН при исследовании зооэнтомологического материала, собранного в центральной части России, вероятно, могла быть связана с комплексом факторов, влияющих на его объёмы и качество (неблагоприятные климатические условия во время сбора материала, выбор биотопов, условия сбора, хранения и транспортировки материала и др.). Вместе с тем об интенсивной циркуляции ВЗН в центральной части России и контакте с ним населения свидетельствовали результаты обследования лихорадящих пациентов, представленные выше.

Отсутствие положительных находок в пробах полевого материала из Западной Сибири также связано с недостаточным для выявления маркеров ВЗН объёмом, который в среднем составил 33 пробы из одного субъекта. В 2021 г. при существенно большем объёме исследованного материала (135 проб из Омской области) РНК ВЗН выявлена в 1 пробе комаров *Coq. richiardii* и 2 пробах клещей *I. persulcatus*. Данные о циркуляции ВЗН в Западной Сибири ограничены Омской, Новосибирской, Томской областями, Красноярским и Алтайским краями [19, 20]. Для объективной оценки ситуации по ЛЗН в Западной Сибири необходимо проведение прицельных исследований, которые позволят получить современные сведения о фауне потенциальных участников энзоотического цикла ВЗН и активности очагов ЛЗН на этих территориях.

В результате исследования патогенности штаммов ВЗН, выделенных в 2022 г., при заражении ими белых мышей для большинства установлено увеличение сроков инкубационного периода заболевания и снижение летальности при сравнении с данными, полученными для штаммов, выделенных в другие годы. Штаммы из Астраханской области и Ставропольского края являлись исключением, были высоковирулентными для лабораторных животных и характеризовались летальностью на уровне 57%. В аналогичных исследованиях, проводившихся со штаммами, выделенными в Австралии, США, Канаде и Европе, также отмечался факт циркуляции штаммов ВЗН, значительно различающихся по вирулентности и нейтроинвазивности [21, 22].

Гетерогенность штаммов ВЗН по признаку патогенности обусловлена их генетическим разнообразием и является следствием адаптации к смене хозяев и переносчиков в энзоотическом цикле, при котором вирус реплицируется в клетках филогенетически отдалённых видов.

## Выводы

1. В ходе комплексных мониторинговых исследований установлена новая северная граница ареала ЛЗН, которая по состоянию на 2022 г. проходит на территории Тверской области.

2. 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.

3. В южном регионе европейской части России преимущественно циркулирует ВЗН 2 генотипа, относящийся как минимум к 2 кладам, сформированным в 2021 и 2022 гг.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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>
- 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>
- 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>
- Батуринов 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>
- 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/gzqzev>
- 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. Geno-

- typing 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., Шукина 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., Smol'yaninov 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*. Nizhny 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/ykuwj>
  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., Яшкулов 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/xcjnfn>
  18. Федорова М.В., Швец 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>

**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*<sup>ORCID</sup> — к.м.н., в.н.с. лаб. эпидемиологического анализа и эпизоотологического мониторинга Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, [vari2@sprint-v.com.ru](mailto: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

**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*<sup>ORCID</sup> — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of epidemiological analysis and epizootological monitoring, Volgograd Research Institute for Plague Control, [vari2@sprint-v.com.ru](mailto: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 bioinformation 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



# Нанокompозиты, состоящие из наночастиц диоксида титана, антисмысловых олигонуклеотидов и фотоактивируемых групп, как агенты для эффективного воздействия на нуклеиновые кислоты

Левина А.С.<sup>1</sup>, Репкова М.Н.<sup>1</sup>, Мазурков О.Ю.<sup>2</sup>, Макаревич Е.В.<sup>2</sup>,  
Мазуркова Н.А.<sup>2</sup>, Зарытова В.Ф.<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>Государственный 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  $TiO_2$ , 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,  $TiO_2$ -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  $TiO_2$ , 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:**  $TiO_2$ -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. Levina<sup>1</sup>, Marina N. Repkova<sup>1</sup>, Oleg Yu. Mazurkov<sup>2</sup>, Elena V. Makarevich<sup>2</sup>, Natalya A. Mazurkova<sup>2</sup>, Valentina F. Zarytova<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>State 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 TiO<sub>2</sub> 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, TiO<sub>2</sub> 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:** TiO<sub>2</sub> 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 ( $\text{TiO}_2$ ) проникают в клетки [6]. В наших предыдущих работах показано, что ON-содержащие наноконпозиты на основе наночастиц  $\text{TiO}_2$  способны проникать через клеточную мембрану [7, 8]. В работах [9–11] продемонстрирован противовирусный эффект наноконпозитов на основе наночастиц  $\text{TiO}_2$ , несущих нативные олигодезоксирибонуклеотиды, в отношении вируса гриппа А.

**Целью** данной работы было создание наноконпозитов, состоящих из наночастиц  $\text{TiO}_2$  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  $\text{TiO}_2$  в кристаллической форме анатаза получали гидролизом изопропоксида титана  $\text{Ti}(\text{O-iPr})_4$  [7, 8].

Наноконпозиты 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. Наноконпозиты второго типа  $\text{TiO}_2/\text{PL}\bullet\text{ON}$  с ионной связью между ON и PL получали при смешивании ON с  $\text{TiO}_2$ -наночастицами с заранее иммобилизованным PL с ёмкостью по аминок группам PL 1 мкмоль/мг [8]. Выход при получении обоих типов наноконпозитов был практически количественный; ёмкость по ON — 20 нмоль/мг.

Все манипуляции с наночастицами и наноконпозитами проводили после обработки ультразвуком в течение 30 с в ультразвуковой ванне («Сапфир»). Характеристика наноконпозитов 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 наноконпозитов 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 наноконпозитах 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 наноконпозитов сохранили свою способность образовывать комплементарные комплексы и могут проникать в эукариотические клетки [7, 8, 11].

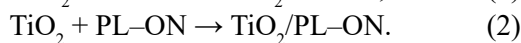
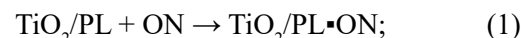
Введение фотоактивируемой арилизидной группы в ON проводили по методу [2] при обработке ON, содержащего концевую аминокгруппу, с помощью  $\text{ArN}_3\text{-SuIm}$  и получали ON\*, содержащий арилизидную группу, который использовали для получения наноконпозитов  $\text{TiO}_2/\text{PL}\bullet\text{ON}^*$ . Наноконпозиты  $\text{TiO}_2/\text{PL}^*\text{-ON}$  получали при обработке наноконпозитов  $\text{TiO}_2/\text{PL-ON}$  с помощью  $\text{ArN}_3\text{-SuIm}$  [13].

Противовирусную активность созданных наноконпозитов исследовали на клетках MDCK, заражённых вирусом A/H3N2 [13]. Заражённые вирусом клетки MDCK, не обработанные наноконпозитами, использовали в качестве контроля.

УФ-облучение заражённых клеток MDCK проводили в процессе инкубации с наноконпозитами лампой «PL-S 9W/10» (350–400 нм, 10 мВ/см<sup>2</sup>, дистанция 1 см; «Philips»).

### Результаты и обсуждение

Для создания наноконпозитов использовали две стратегии [8]. Первый метод (1) состоит в электростатическом связывании ON с предварительно подготовленными наночастицами, покрытыми PL ( $\text{TiO}_2/\text{PL}$ ). Второй метод (2) состоит в иммобилизации PL-содержащих олигодезоксирибонуклеотидов (PL-ON) на  $\text{TiO}_2$ -наночастицах.



Для получения фотоактивируемых наноконпозитов в первом случае на наночастицах  $\text{TiO}_2/\text{PL}$  иммобилизовали ON с предварительно введённой фотоактивируемой арилизидной группой [2] и получали наноконпозиты  $\text{TiO}_2/\text{PL}\bullet\text{ON}^*$ . Во втором случае перфторарилазидную группу присоединяли к аминокгруппам PL в сформированном наноконпозите и получали  $\text{TiO}_2/\text{PL}^*\text{-ON}$ . Таким образом, получены два типа наноконпозитов: 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.

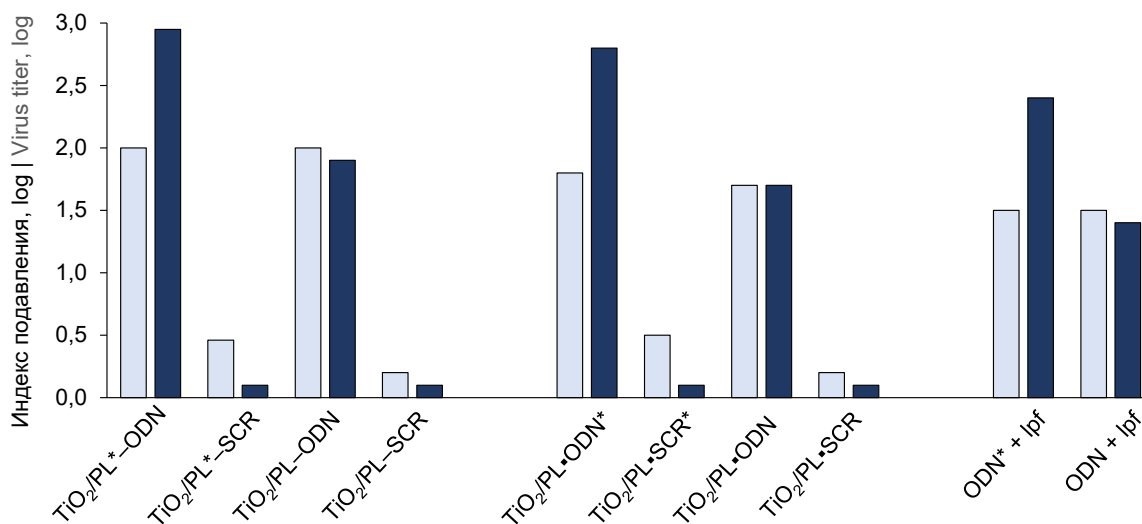
В исследованиях противовирусной активности на клетках MDCK, заражённых вирусом А/Н3N2, использовали нанокompозиты в нетоксичной для клеток концентрации 100 мкг/мл. Ингибирование вируса в клетках MDCK выражали в виде логарифма индекса подавления продукции (ИПП) вируса. Значение log ИПП равняется разности 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 TiO<sub>2</sub>, 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. TiO<sub>2</sub>-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 наноконструкции, состоящие из трех функциональных компонентов: наночастиц  $\text{TiO}_2$ , 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 наноконструкций для воздействия на НК-мишени на примере ингибирования репликации вируса гриппа А в клеточной системе. Показано, что наноконструкции, 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  $\text{TiO}_2$ -DNA-наноконструкций, способных проникать в клетки. *Биоорганическая химия.* 2013;39(1):87–98. Levina A.S., Repkova M.N., Shatskaya N.V., et al. Design of  $\text{TiO}_2$ -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/reyqpd>
9. Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., et al. High antiviral effect of  $\text{TiO}_2$ :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  $\text{TiO}_2$ -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. Наноконструктив 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*<sup>✉</sup> — д.х.н., г.н.с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, [zarytova@niboch.ncs.ru](mailto: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*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, [zarytova@niboch.ncs.ru](mailto: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<sup>✉</sup>

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. <sup>✉</sup>

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 $\gamma$ . 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 ( $-\log_{10} P$  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

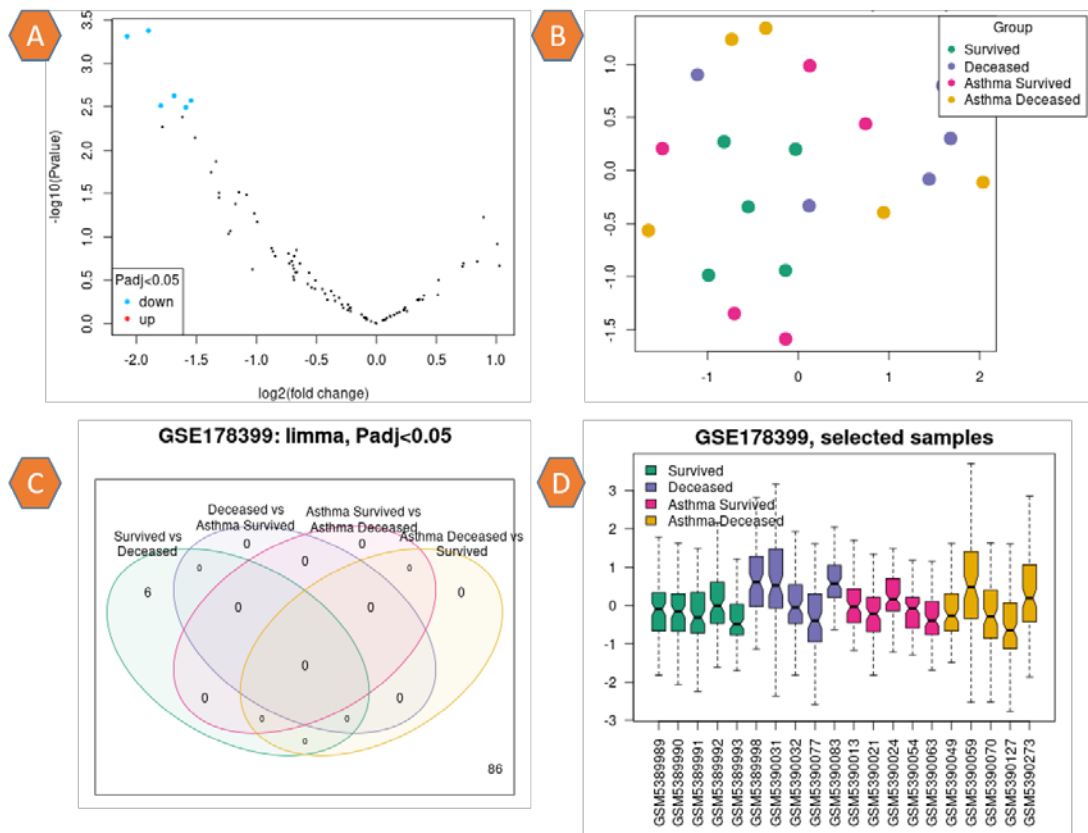
**Table 1.** Profiles of COVID-19 patients, 0 = Non-asthma, 1 = Asthma

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	=

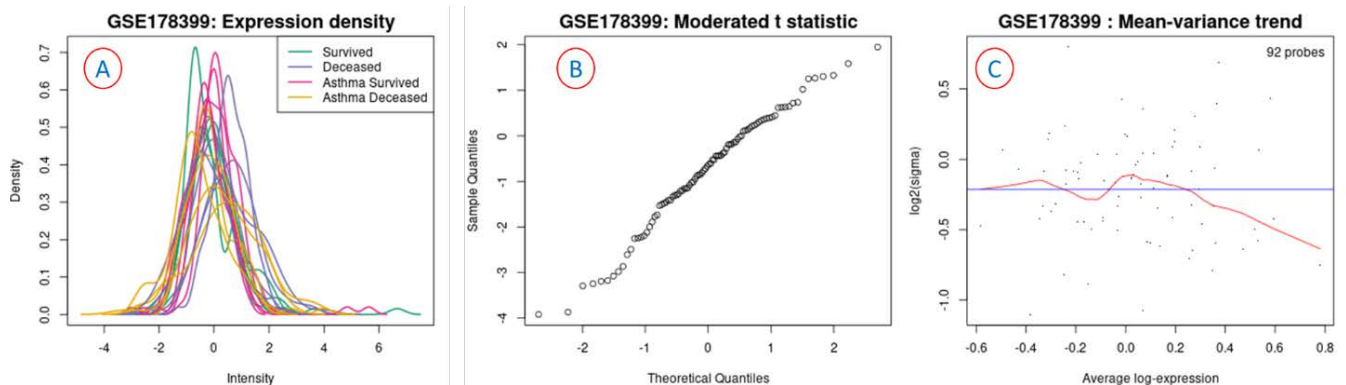
distributed in groups. The distribution's width can be utilized to determine whether the selected samples are suitable for differential expression analysis. The values of the patient samples centered on the median indicate that the data are standardized and mutually comparable, implying that all of the 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.



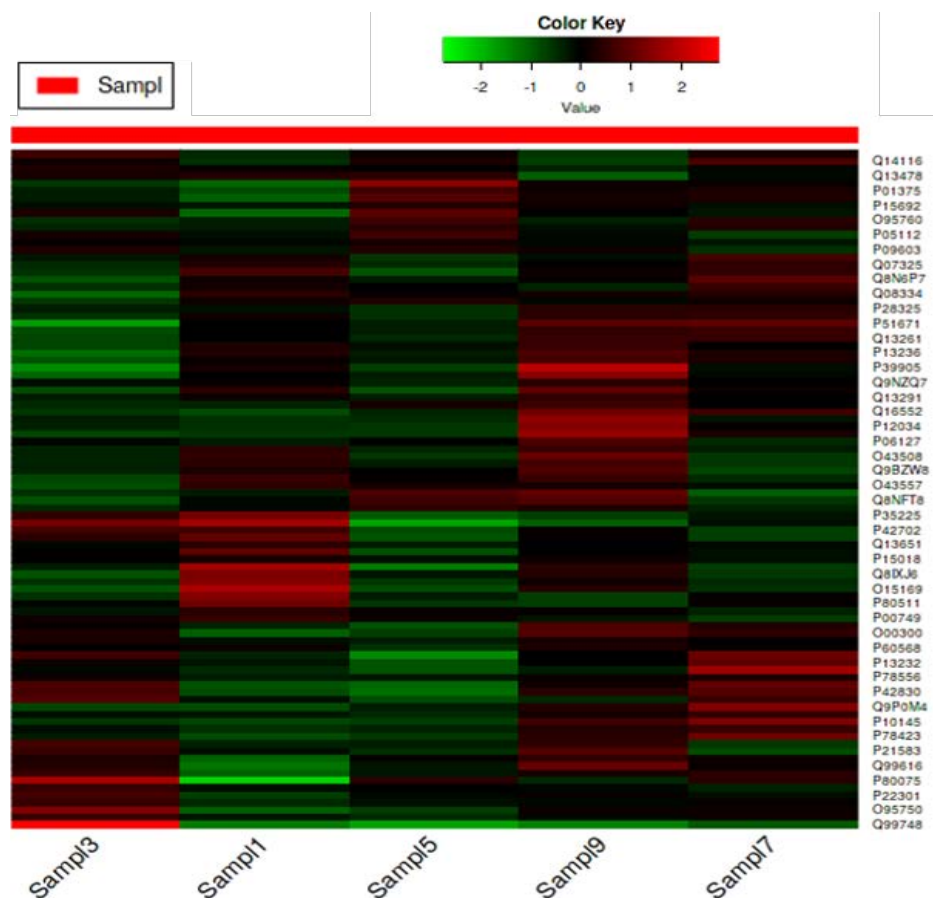
**Fig. 2.** a: plotDensities: Distribution of samples divided into four groups according to color. b: limma (qqt): Arrangement of dataset to the theoretical quantiles of the t-test distribution. c: Voorna plot: The mean correlation variance of the expression data.

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*,



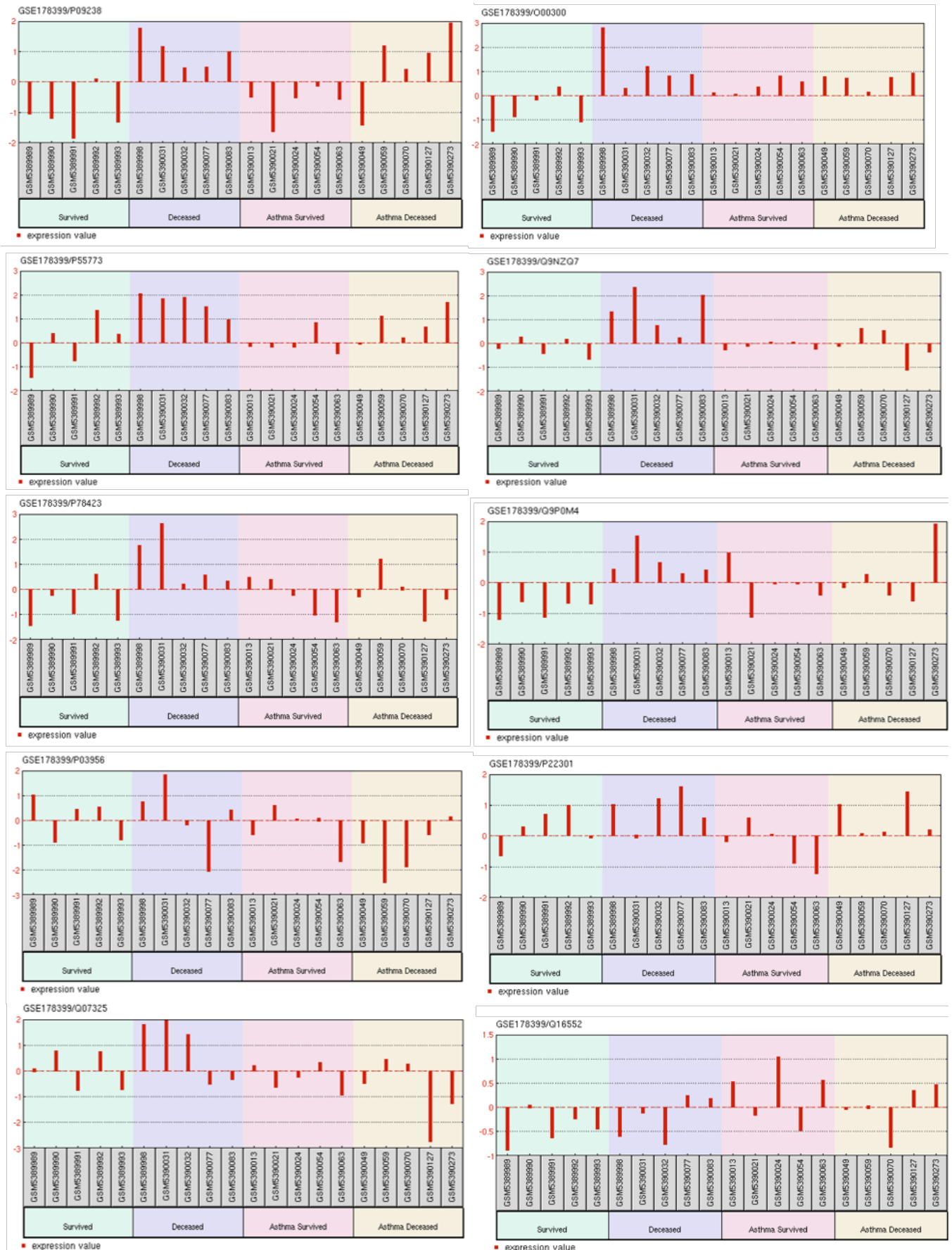
**Fig. 3.** Heatmap of the 20 samples gene expression. The scale of expression is between (–3 down-regulation to 3 up-regulation).

*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

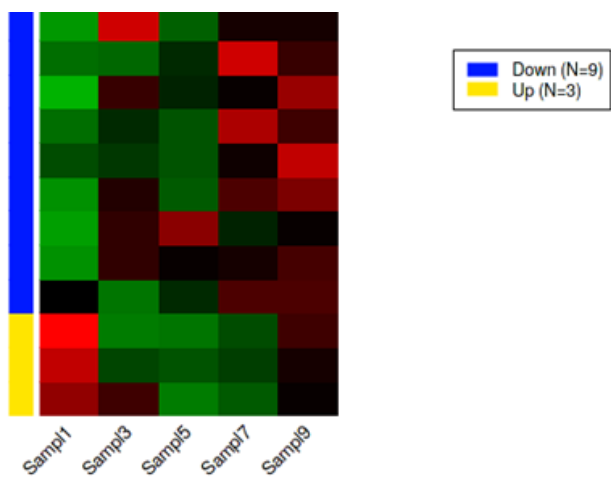
10 immune genes are depicted in Fig. 6, a. Seven of ten genes were shown to have a distinct cumulative association after clustering, as shown in Fig. 6, b. Proteins whose gene expression is associated across a wide range of tests. Figure 7 illustrates coexpression scores based on protein co-regulation and RNA expression patterns. Proteins that coexpress the 10 genes under study are as-

**Table 2.** Expression selected genes and their IDs

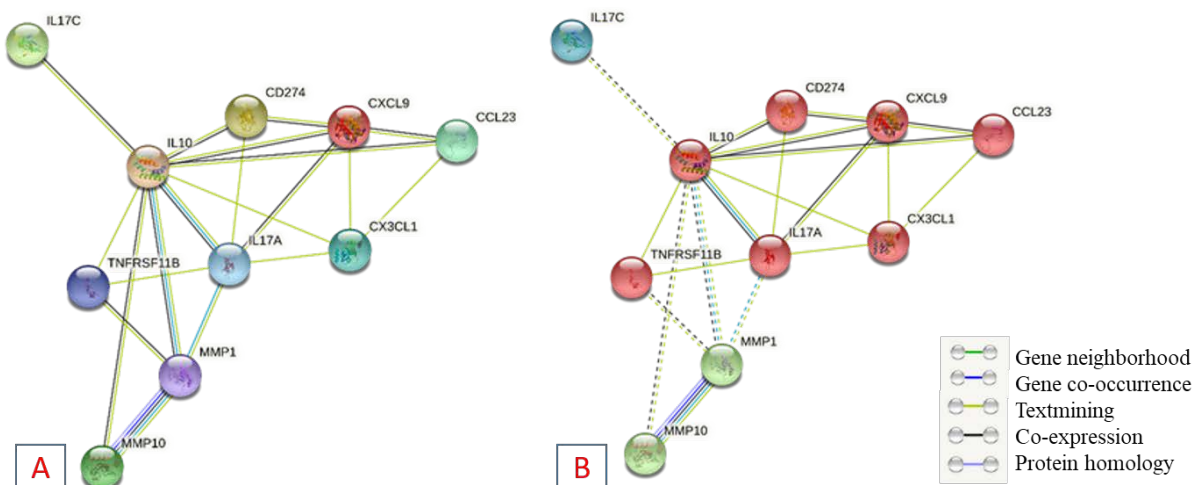
ID	Adj. P. Val	P. Value	Frequency	Common name of gene	Node degree	Expression
P09238	0.0804	0.000874	7.0282	<i>MMP10</i> (Matrix metalloproteinase-10 )	2	Down Regulation
O00300	0.1472	0.003633	5.47	<i>TNFRSF11B</i> (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B)	3	Down-Regulation
P55773	0.1472	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.

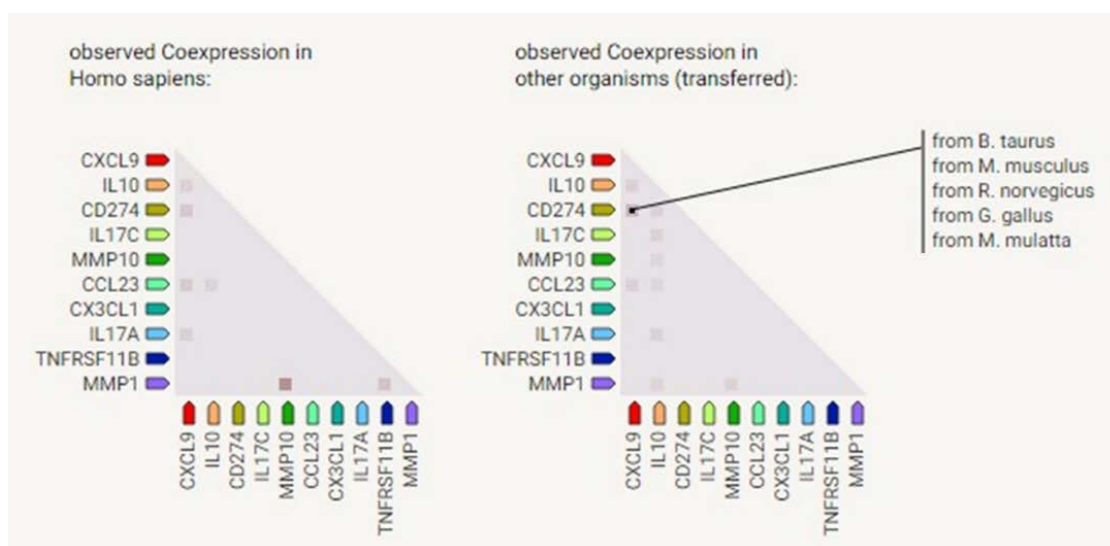


**Fig. 5.** Heatmap of expression genes shows the correlation of high significant of down regulation.

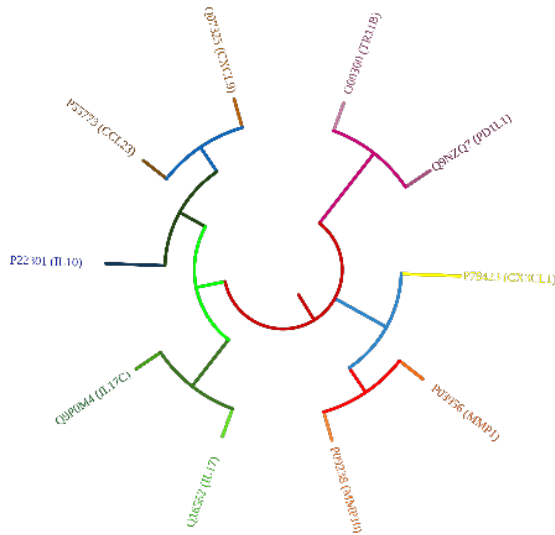


**Fig. 6.** Multi-interactions views between nodes of immune genes.

*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**.

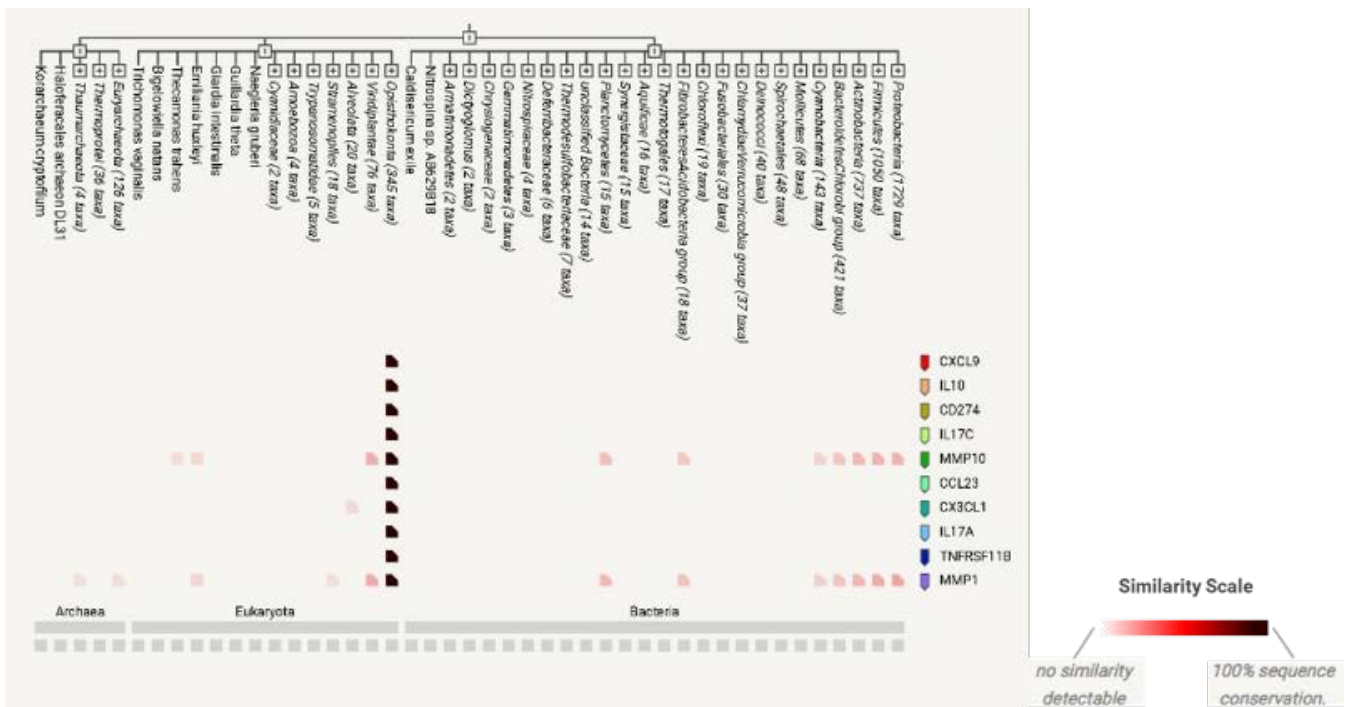
### Discussion

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<sup>✉</sup> — Ph.D. Microbiology (Biology science), Dr. (Anatomy department), University of Mosul, Mosul, Iraq, [aad@uomosul.edu.iq](mailto: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. <sup>✉</sup> — к.б.н., лектор, кафедра анатомии Медицинского колледжа Мосульского университета, Мосул, Ирак, [aad@uomosul.edu.iq](mailto: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.<sup>✉</sup>, [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<sup>✉</sup>, [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 суспензионном 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 культур<sup>1</sup> и Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур<sup>2</sup> [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 абортрованного плода), MRC-5 (диплоидные клетки лёгочной ткани 14-недельных человеческих эмбрионов мужского пола), DBS-FR<sub>h</sub>-2 (диплоидная КЛ эмбриональной ткани макака 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.

<sup>1</sup> American Type Culture Collection. URL: <http://www.atcc.org>

<sup>2</sup> 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  $\alpha$ -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  $\beta$ -галактозидазу,  $\beta$ -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,  $\beta$ -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

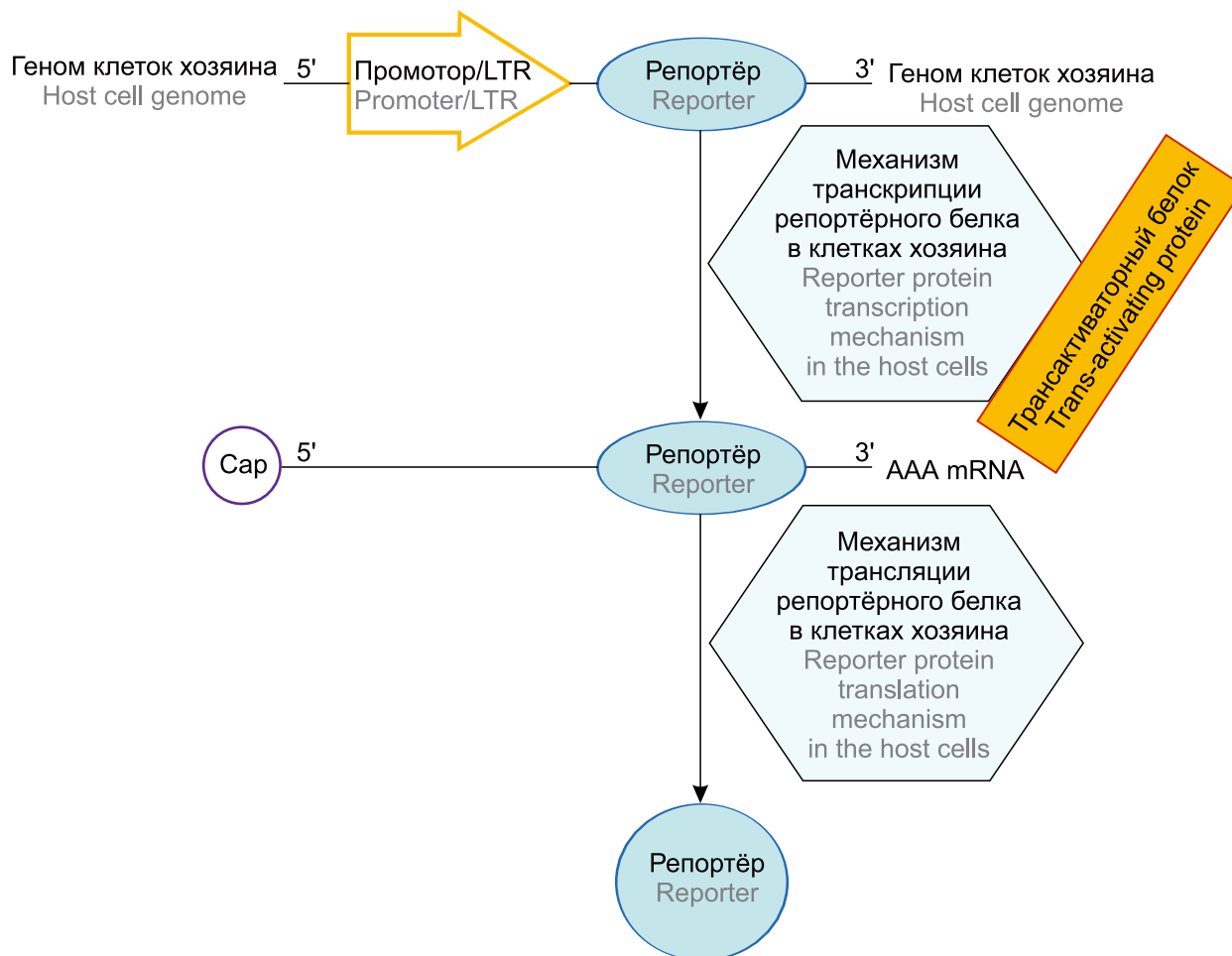
репортёрные КЛ требуют наличия лабораторий с определённым уровнем биобезопасности, как впрочем и все работы с КК, по мнению ряда авторов, они менее трудоёмки, чем метод бляшкообразования [24, 25]. Другим преимуществом таких КЛ является более быстрое исследование вирусов, включая оценку титров вируснейтрализующих 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. *Biotechniques*. 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](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<sup>pro</sup> 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<sup>pro</sup> 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/fxehvq>
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/10.1007/978-1-4939-9211-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9211-1_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<sup>✉</sup> — д.м.н., г.н.с. лаб. диагностических препаратов, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, [takuznets@mail.ru](mailto: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<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of diagnostic preparates, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, [takuznets@mail.ru](mailto: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*

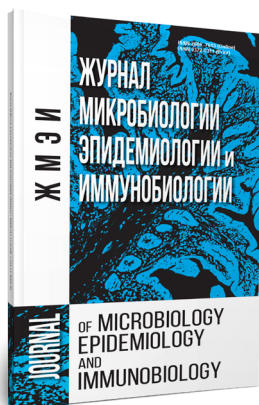
## ИНФОРМАЦИЯ ВСЕРОССИЙСКОГО НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

### 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 иммунобиологии»  
распространяется по подписке:

ГК «Урал-Пресс»

Подписной индекс: **71436.**

Подписка на любое количество номеров.

Сайт: [www.ural-press.ru](http://www.ural-press.ru)

Контакты: +7(343)262-65-43, [info@ural-press.ru](mailto:info@ural-press.ru)