

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

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

2

MARCH – APRIL

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.

2

МАРТ – АПРЕЛЬ

**ТОМ 101
2024**

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

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

DOI prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Используется сервис CrossMark для
поддержания контента журнала
в актуальном состоянии и информирования
читателей об изменениях в опубликованных
статьях.

При публикации статьи на русском
и английском языках статья
размещается под одним DOI.
Переводы публикуются на сайте журнала.

**Журнал представлен
в международных базах данных
и информационно-справочных
системах:**
RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's
Periodicals Directory, ROAD; EBSCO
Publishing (на платформе EBSCOhost);
ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT;
ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef;
Dimensions.

ПОДПИСКА:
ГК «Урал-пресс», индекс: 71436.
Тел.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

**Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:**
<https://microbiol.crie.ru>;
<https://www.elibrary.ru>;
<https://www.cyberleninka.ru>;
<https://www.rucont.ru>;
<https://www.ebsco.com>;
<https://www.doaj.org>;
<http://www.elsevier.com>

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru

Всероссийское научно-практическое
общество эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов
<http://npromp.ru>

ИЗДАТЕЛЬ:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

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

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:
111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

Заведующая редакцией:
Устинкова Ольга Владимировна
Журнал размещает рекламу в соответствии
с ФЗ РФ от 13.03.2006 № 38-ФЗ
«О рекламе» и рекламной политикой.

К публикации принимаются только статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов (<https://microbiol.crie.ru>).

Направляя статью в редакцию, авторы
принимают условия договора публичной
оферты (<https://microbiol.crie.ru>).

Подписано в печать 29.04.2024.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместители главного редактора

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

Ответственные секретари

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., академик РАН, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия
Брико Н.И., д.м.н., проф., академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия
Брусина Е.Б., д.м.н., проф., член-корр. РАН, Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия
Бухарин О.В., д.м.н., проф., академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

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

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

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

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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

Michael O. Favorov, PhD, D.Sci. (Medicine), DiaPrep System Inc., Atlanta, GA, United States; Chief Scientific Officer, Turklab, Turkey

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, European Academy of Natural Sciences, R. Koch Medical Society (Germany), German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Дьяков И.Н., к.б.н., Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия
Кюрегян К.К., д.б.н., проф., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, Biotech Innovation Research Development & Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

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

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

Мескина Е.Р., д.м.н., Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

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

16+

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.

2

MARCH-APRIL

VOLUME 101

2024

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-75442

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

DOI prefix: 10.36233

The journal is an Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Common Attribution International 4.0 CC-BY.

The CrossMark service is used.

Some articles are translated into English under the decision of the Editorial Board. When publishing an article in Russian and English, the translated article is placed under the same DOI on the Journal's website.

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

RSCI; RUSMED; SCOPUS; DOAJ; Ulrich's Periodicals Directory, ROAD; EBSCO Publishing (на платформе EBSCOhost); ROAD; HYPERLINK; OPENALEX; FATCAT; ZEITSCHRIFTEN DATENBANK; CrossRef; Dimensions.

Index for subscription to the printed version of the journal:

Ural Press: 71436.
Tel.: +7(343) 262-65-43.
E-mail: info@ural-press.ru.

Full texts of issues of the journal are available:

<https://microbiol.crie.ru/>;
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com/>;
<https://www.doaj.org/>;
<http://www.elsevier.com>

FOUNDERS:

Central Research Institute for Epidemiology
www.crie.ru

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

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pck.ru

EDITORIAL OFFICE:

5A, Maly Kazenny per.,
Moscow, 105064, Russia.
Tel.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://microbiol.crie.ru>) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://microbiol.crie.ru>).

Signed to the press on April 29, 2024.

Print format 60×90^{1/8}.

Circulation 158 copies.

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

E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

EDITOR-IN-CHIEF

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biology), RAS Full Member, Professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy Editors

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

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

Executive Secretaries

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

Konstantin O. Mironov, Dr. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

Vasily G. Akimkin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Alexander N. 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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

Ilya N. Dyakov, Cand. Sci. (Biology), Head, Laboratory of biosynthesis of immunoglobulins, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Karen K. Kyuregyan, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

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

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУКИ

- Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Хафизов К.Ф., Углева С.В., Дубоделов Д.В., Колосовская Е.Н.**
Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы* 163

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Воронина О.Л., Королева Е.А., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Капотина Л.Н., Нелюбина С.А., Лазарева А.В., Зигангирова Н.А.**
Влияние инновационного антибактериального препарата класса тиадiazинонов на факторы вирулентности бактерий филума *Pseudomonadota*, хронически инфицирующих больных муковисцидозом* 173
- Осадчая О.А., Киреев Д.Е., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Шлыкова А.В., Махмудова Л.Ф., Ладная Н.Н., Овакимян Э.М., Мартоян С.В., Казарян О.К., Овсепян Т.В., Саргсянц Н.К., Покровский В.В.**
Исследование устойчивости вируса иммунодефицита человека типа I к антиретровирусным препаратам у наивных пациентов в Армении в 2017–2021 годах* 184
- Отрашевская Е.В., Каа К.В., Оксанич А.С., Мурашко Н.В., Куслий А.Г., Красько А.Г., Зверев В.В., Игнатьев Г.М.**
Изучение гуморального и клеточного иммунитета при иммунизации мышей линии С57Bl/6 прототипом инактивированной вакцины Чикунгунья* 193
- Морозова М.В., Коркина В.И., Макарова М.А., Литвинова Е.А.**
Влияние *Bacillus subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2^{-/-}* 208
- Шалепо К.В., Хуснутдинова Т.А., Будилова О.В., Крысанова А.А., Сапожников К.В., Савичева А.М., Коган И.Ю.**
Молекулярно-генетические детерминанты вирулентности *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных и новорожденных Санкт-Петербурга и Ленинградской области в 2010–2023 годах* 217
- Карташов М.Ю., Волчев Е.Г., Кривошеина Е.И., Свиринов К.А., Терновой В.А., Локтев В.Б.**
Генотипирование боррелий, риккетсий и анаплазм в клещах *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus* в Калининградской области* 227
- Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Печковский Г.А., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н.**
Полиморфизм генов рецепторов герминации спор у штаммов *Bacillus anthracis* основных генетических линий 237

НАУКА И ПРАКТИКА

- Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кислицина Е.В., Германчук В.Г.**
Оценка возможности применения иммуномодулирующих лекарственных препаратов для экстренной профилактики экспериментальной чумы, вызванной вирулентным штаммом основного подвида *Yersinia pestis* 248

ОБЗОРЫ

- Никишов О.Н., Кузин А.А., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Никишов С.Н.**
Парвовирусная В19 инфекция: характеристика популяционного иммунитета в мире* 259
- Бондарева О.С., Батуринов А.А., Миронова А.В.**
Рекомбиназная полимеразная амплификация: характеристика метода и применение в диагностике инфекционных заболеваний 270
- Царева Т.В., Балмасова И.П., Царев В.Н.**
Поддесневой микробиом при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (метаанализ)* 281

НЕКРОЛОГИ

- Памяти Алексея Кимовича Носкова (14.04.1971–31.03.2024) 293

ЮБИЛЕИ

- Урываев Л.В.**
Выдающийся деятель отечественного здравоохранения и медицинской науки XX века Виктор Михайлович Жданов (к 110-летию со дня рождения) 295

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

CONTENTS

TOPICAL ISSUES IN SCIENCE

- Akimkin V.G., Semenenko T.A., Khafizov K.F., Ugleva S.V., Dubodelov D.V., Kolosovskaya E.N.**
 Genomic surveillance strategy. Problems and perspectives* 163

ORIGINAL RESEARCHES

- Voronina O.L., Koroleva E.A., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kapotina L.N., Nelyubina S.A., Lazareva A.V., Zigangirova N.A.**
 The influence of an innovative antibacterial drug of the thiadiazinone class on the virulence factors of bacteria of the phylum *Pseudomonadota*, which chronically infect patients with cystic fibrosis* 173
- Osadchaya O.A., Kireev D.E., Saleeva D.V., Kirichenko A.A., Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Shlykova A.V., Makhmudova L.F., Ladnaya N.N., Hovakimyan E.M., Martoyan S.V., Kazaryan H.K., Hovsepyan T.V., Sargsyants N.K., Pokrovsky V.V.**
 HIV-1 drug resistance among naïve patients in Armenia in 2017–2021* 184
- Otrashevskaya E.V., Kaa K.V., Oksanich A.S., Murashko N.V., Kuslij A.G., Krasjko A.G., Zverev V.V., Ignatyev G.M.**
 Study of humoral and cellular immunity following the immunization of C57Bl/6 mice with a prototype of the inactivated Chikungunya vaccine* 193
- Morozova M.V., Korkina V.I., Makarova M.A., Litvinova E.A.**
 Effect of the *Bacillus subtilis* BS20 on physiological and immune parameters in mutant mice *Muc2*^{-/-} 208
- Shalepo K.V., Khusnutdinova T.A., Budilovskaya O.V., Krysanova A.A., Sapozhnikov K.V., Savicheva A.M., Kogan I.Yu.**
 Molecular genetic determinants of virulence of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg and the Leningrad region in 2010–2023* 217
- Kartashov M.Yu., Volchev E.G., Krivosheina E.I., Svirin K.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B.**
 Genotyping of *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the Kaliningrad region* 227
- Eremenko E.I., Pechkovskii G.A., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N.**
 Polymorphism of spore germination receptor genes in *Bacillus anthracis* strains of major genetic lineages 237

SCIENCE AND PRACTICE

- Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kislitsina E.V., Germanchuk V.G.**
 Assessment of the effect of using immunomodulatory drugs for emergency prevention of experimental plague caused by a virulent strain of the main subspecies *Yersinia pestis* 248

REVIEWS

- Nikishov O.N., Kuzin A.A., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Nikishov S.N.**
 Parvovirus B19 infection: characteristics of population immunity in the world* 259
- Bondareva O.S., Baturin A.A., Mironova A.V.**
 Recombinase polymerase amplification: method's characteristics and applications in diagnostics of infectious diseases 270
- Tsareva T.V., Balmasova I.P., Tsarev V.N.**
 Subgingival microbiome in periodontal disease and comorbid pathology (meta-analysis)* 281

OBITUARIES

- In memory of Andrey Kimovich Noskov (April 14, 1971 – March 31, 2024) 293

ANNIVERSARIES

- Uryvaev L.V.**
 An outstanding figure in domestic healthcare and medical science of the twentieth century, Viktor Mikhailovich Zhdanov (on the 110th anniversary of his birth) 295

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

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАУКИ

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-507>



Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы

Акимкин В.Г.¹, Семенов Т.А.², Хафизов К.Ф.¹, Углева С.В.^{1✉},
Дубоделов Д.В.¹, Колосовская Е.Н.³

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

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия;

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Понятие эпидемиологического надзора является одним из базовых в теории и практике эпидемиологической науки. В России обобщение накопленного фактического материала и теоретические разработки позволили сформулировать ряд положений о сущности эпидемического процесса. Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) внесла коррективы во все сферы жизни общества, в том числе в деятельность системы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, требующие разработки и реализации инновационных решений. Опираясь на опыт оперативного реагирования на задачи, поставленные пандемией COVID-19, авторами поднята проблема разработки и внедрения системы молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями новых и возвращающихся инфекций как приоритетного вектора развития эпидемиологического надзора.

Обосновано внедрение в систему эпидемиологического надзора современных молекулярно-биологических технологий идентификации патогенов с эпидемическим потенциалом с учётом их генетического разнообразия на опыте использования платформенных решений, созданных ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Разработана стратегия геномного эпидемиологического надзора как мощного инструмента для обеспечения готовности к осуществлению мер реагирования и управления эпидемическим процессом путём осуществления и корректировки профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Внедрена в практику разработанная на базе ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора Российская платформа агрегации информации о геномах вирусов (VGARus) как технологическая, научная и организационная и инфраструктурная база геномного эпидемиологического надзора, выполняющая роль межведомственного консорциума. Показана эффективность VGARus для оценки мутационной изменчивости SARS-CoV-2, влияния эволюционного развития циркулирующих возбудителей на характеристики эпидемического процесса, осуществления оперативного и ретроспективного анализа заболеваемости и прогноза распространения генетических вариантов возбудителей.

Ключевые слова: эпидемиологический надзор, COVID-19, SARS-CoV-2, молекулярно-генетический мониторинг, геномный эпидемиологический надзор

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: Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Хафизов К.Ф., Углева С.В., Дубоделов Д.В., Колосовская Е.Н. Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):163–172.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-507>

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

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-507>

Genomic surveillance strategy. Problems and perspectives

Vasily G. Akimkin¹, Tatyana A. Semenenko², Kamil F. Khafizov¹, Svetlana V. Ugleva^{1✉}, Dmitry V. Dubodelov¹, Elena N. Kolosovskaya³

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia;

²N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

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

Abstract

The topic of epidemiologic surveillance is one of the basic concepts in the theory and practice of epidemiologic science. In Russia, generalization of the accumulated factual material and theoretical developments have allowed us to formulate a number of provisions on the nature of the epidemic process. The pandemic of a new coronavirus infection has forced adjustments in all spheres of society, including the activities of the infectious disease epidemiological surveillance system, requiring the development and implementation of innovative solutions. Based on the experience of prompt response to the tasks set by the COVID-19 pandemic, the authors raised the problem of development and implementation of a system of molecular genetic monitoring for pathogens of emerging and re-emerging infections as a priority vector of epidemiological surveillance development.

The introduction of modern molecular biological technologies for the identification of pathogens with epidemic potential, taking into account their genetic diversity, into the system of epidemiologic surveillance has been substantiated based on the experience of using platform solutions created by the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor. The strategy of genomic epidemiologic surveillance as a powerful tool to ensure readiness for response measures and management of the epidemic process by implementing and adjusting preventive and anti-epidemic measures was developed.

The Russian platform for aggregation of information on virus genomes (VGARus) developed at the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor as a technological, scientific, organizational and infrastructural base of genomic epidemiological surveillance, acting as an interdepartmental consortium, has been introduced into practice. The efficiency of VGARus was shown to assess the mutational variability of SARS-CoV-2, the influence of evolutionary development of circulating pathogens on the characteristics of the epidemic process, the implementation of operational and retrospective analysis of morbidity and prediction of the spread of genetic variants of pathogens.

Keywords: *epidemiologic surveillance, COVID-19, SARS-CoV-2, molecular genetic monitoring, genomic epidemiologic surveillance*

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: Akimkin V.G., Semenenko T.A., Khafizov K.F., Ugleva S.V., Dubodelov D.V., Kolosovskaya E.N. Genomic surveillance strategy. Problems and perspectives. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):163–172.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-507>

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

Введение

Растущая угроза эпидемических и эпизоотических вспышек новых и вновь возникающих инфекций, большинство из которых характеризуются внезапностью возникновения, высокой смертностью, отсутствием специфических методов диагностики и лечения, требует разработки новых подходов к организации эпидемиологического надзора. В контексте общественного здравоохранения системный контроль и управление эпидемическим процессом инфекционных и паразитарных болезней тесно связаны с проблемой биологической безопасности, которая чрезвычайно актуальна для всех стран в связи

с расширением спектра реальных и потенциальных угроз, вызванных воздействием опасных агентов биологической природы [1–3].

Система эпидемиологического надзора

Понятие эпидемиологического надзора является одним из базовых в теории и практике эпидемиологической науки. В России обобщение накопленного фактического материала и теоретические разработки позволили сформулировать ряд концепций и положений о сущности эпидемического процесса: теорию механизма передачи возбудителей инфекций Л.В. Громашевского [4] и теорию природной очаго-

ности инфекционных болезней Е.Н. Павловского [5]. На основании этих теорий ведущими учёными страны были разработаны основные положения эпидемиологического надзора, имевшие, однако, некоторые различия в трактовке. В социально-экологической концепции эпидемического процесса, сформулированной академиком Б.Л. Черкасским, эпидемиологический надзор определялся как система динамического и комплексного слежения за эпидемическим процессом конкретной болезни на определённой территории в целях рационализации и повышения эффективности профилактических и противоэпидемических мероприятий [6]. Согласно определению академика В.И. Покровского, эпидемиологический надзор — это «информационное обеспечение системы профилактики инфекционных заболеваний, гарантирующее всестороннее слежение за эпидемическим процессом и его детерминантами (скрининг) и чётко реагирующее на все возможные изменения в его развитии (мониторинг)» [7].

В соответствии с теорией академика В.Д. Белякова основу развития эпидемического процесса составляют фазовые изменения гетерогенности биологических свойств взаимодействующих популяций возбудителя и человека, базирующиеся на обратных связях в процессе саморегуляции, при этом важное значение имеют социальные и природные факторы [8]. Согласно данной теории, эпидемиологический надзор рассматривается как управленческая система, предполагающая динамическую оценку тенденций развития эпидемического процесса в пространстве и времени, обеспечивающая своевременное вмешательство в его ход с целью снижения заболеваемости совокупного населения, ликвидации отдельных инфекций [9]. В этом определении цели эпидемиологического надзора совпадают с целями противоэпидемической системы в целом. Именно концепция о механизме саморегуляции паразитарных систем легла в фундаментальную основу разработанной в современный период практики проведения эпидемиологического надзора, который определяется как непрерывная оценка состояния и тенденций развития эпидемического процесса для своевременного принятия управленческих решений, обеспечивающих проведение адекватных ситуации мероприятий.

Значимые различия в понимании сущности эпидемиологического надзора между российскими и зарубежными специалистами отсутствуют, однако акценты расставлены иначе. Так, согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), эпидемиологический надзор — это систематический непрерывный сбор, сопоставление, анализ данных и своевременное распространение информации среди заинтересованных лиц для принятия определённых решений [10]. В отечественной системе здравоохранения общее признание получи-

ло положение о том, что объектом эпидемиологического надзора является эпидемический процесс, представляющий собой единство биологических, природных и социальных факторов, а сам надзор стали рассматривать как инструмент его познания.

Система эпидемиологического надзора включает три взаимосвязанные подсистемы: информационную, диагностическую и управленческую.

Информационная подсистема является базовым разделом эпидемиологического надзора, в рамках которой учитываются и регистрируются данные о состоянии и тенденциях развития эпидемического процесса, причинах (биологический фактор) и условиях (социальный и природный факторы), поддерживающих его на конкретной территории. В зависимости от эпидемиологических особенностей инфекционной болезни, уровня теоретических знаний и практических возможностей реализуются эпидемиологический и социально-экологический мониторинг.

Диагностическая подсистема предусматривает предэпидемическую диагностику, включающую своевременное обнаружение предпосылок и предвестников эпидемического неблагополучия, а также прогнозирование дальнейшего развития эпидемической ситуации на основе оценки всех потоков информации.

Управленческая подсистема ориентирована на включение в эпидемиологический надзор информационных, диагностических и аналитических данных с учётом современных достижений науки и практики. Управленческие решения предполагают составление проблемно-тематических и программно-целевых планов, контроль за их исполнением и внесение уточнений в тактику проводимых мероприятий с учётом изменяющихся факторов риска [11].

Российская платформа агрегации информации о геномах вирусов

Пандемия новой коронавирусной инфекции внесла коррективы во все сферы жизни общества, в том числе в деятельность системы здравоохранения. На XII Съезде Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» были обозначены основные вехи дальнейшего развития санитарно-эпидемиологической службы страны с учётом трансформации общей парадигмы эпидемиологического надзора и контроля. Изменения социально-экономической и эпидемиологической ситуации в России, возрастающее давление на человека неблагоприятных факторов окружающей среды, процессы урбанизации, развитие новых технологий в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве находят отражение в состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Очевидно, что эти тенденции

требуют принципиально новых подходов к организации и проведению эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, разработки нормативного и правового обеспечения, внедрения научных решений в практику [12].

Пандемия COVID-19 ярко продемонстрировала разрушительные последствия массовых инфекционных заболеваний, которые уносят миллионы человеческих жизней и подрывают мировую экономику. Катастрофическая экспансия заболеваемости новой коронавирусной инфекцией не только обнажила проблемы системы здравоохранения большинства стран, но и явилась импульсом научного прогресса во многих областях медицинских и биологических наук. Глобальное распространение новой инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, способствовало разработке инновационных инструментов и технологий в различных сферах деятельности и ускорило интеграцию геномных исследований в практику общественного здравоохранения. Возникла острая необходимость в разработке новых подходов к организации эпидемиологического анализа и прогнозирования развития эпидемического процесса COVID-19 с использованием инновационных платформенных решений и цифровых технологий.

Организационная миссия создания системы молекулярно-генетического мониторинга во время пандемии COVID-19 принадлежит руководителю Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.Ю. Поповой. В соответствии с поставленными задачами и благодаря огромному опыту противоэпидемической работы в России была внедрена стратегия опережающего реагирования на распространение новой коронавирусной инфекции, которая позволила не допустить чрезмерной нагрузки на систему здравоохранения, спасти миллионы жизней и предотвратить масштабные негативные последствия для всех сфер жизни [13, 14].

В соответствии с Постановлением Правительства РФ от 23.03.2021 № 448 «Об утверждении Временного порядка предоставления данных расшифровки генома возбудителя новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» для обеспечения быстрой оценки динамики распространения известных и новых геновариантов SARS-CoV-2, циркулирующих на территории страны, была разработана и внедрена Российская платформа агрегации информации о геномах вирусов (Virus Genome Aggregator of Russia — VGARus), которая содержит информацию о нуклеотидных последовательностях вирусов SARS-CoV-2 и их мутациях, распространённых в регионах России, и может быть использована для хранения, систематизации и выборки данных для выявления мутаций и определения геновариантов вируса. Разработчиком VGARus и консолидирующей

её основой стал ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Программное обеспечение, интегрированное в платформу VGARus, позволяет анализировать результаты секвенирования, определять вероятный штамм вируса, формировать стандартизированные отчёты, загружать образцы, предназначенные для дальнейшего секвенирования [15]. VGARus даёт возможность постоянно вести мониторинг мутационной изменчивости SARS-CoV-2, предоставляя важнейшие данные для обнаружения новых геновариантов и отслеживания их распространённости на территории России. Алгоритм работы с данными VGARus позволяет осуществлять оперативный и ретроспективный анализ распространения генетических вариантов SARS-CoV-2 с учётом новейших сведений о генетическом разнообразии возбудителя COVID-19.

Основной целью создания VGARus является централизация сбора и анализа динамики и структуры выявленных вариантов SARS-CoV-2 в России [16]. В настоящее время все научные учреждения России, занимающиеся секвенированием геномов коронавируса и зарегистрировавшиеся на портале в качестве пользователей, имеют возможность выложить изучаемые геномные последовательности в VGARus. Полученные регистрационные удостоверения позволяют её участникам использовать информацию национальной базы данных. Доступ к платформе осуществляется через портал genome.crie.ru.

Таким образом, фактически создан научный консорциум, в который вошли учреждения Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения РФ и ряда других ведомств. В настоящее время в систему VGARus интегрированы более 150 организаций, значительная часть из них выполняет массовое секвенирование геномов SARS-CoV-2 и загружает последовательности. Предварительно проводится оценка качества этих образцов, которая обычно включает анализ с использованием полимеразной цепной реакции для определения вирусной нагрузки и оценки пригодности образца для полногеномного секвенирования нового поколения. Запущенные в базе данных алгоритмы в автоматическом режиме проводят анализ мутаций и идентификацию варианта SARS-CoV-2 в каждом образце. После загрузки нуклеотидной последовательности вируса система автоматически запускает процесс валидации сиквенса, анализ принадлежности к тому или иному геноварианту. Обработка загруженной геномной информации осуществляется с помощью программ Pangolin и V-TRACE (разработка специалистов ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в автоматизированном режиме с последующим биоинформационным анализом.

Каждый образец в системе содержит не только нуклеотидную последовательность и технические

данные, но и информацию о месте и времени сбора биологического материала, а также данные об обследованном человеке: пол, регион, возраст, статус вакцинации, предполагаемое число контактов, сопутствующие заболевания, недавние зарубежные поездки и т.д. Эти данные, учитывая эпидемиологическую значимость, позволят использовать их для оперативного и ретроспективного анализа. При регистрации в базе данных образцы автоматически получают внутренний регистрационный номер, после чего в поле информации об образце может быть добавлена последовательность генома SARS-CoV-2. Техническая информация также включает данные об организациях, участвовавших в сборе, лабораторной пробоподготовке образцов, дату отправки и получения образца, дату внесения информации и формирования текущей записи в системе [17–20].

Молекулярно-генетический мониторинг во время пандемии COVID-19

Национальная база данных VGARus, содержащая большой набор последовательностей SARS-CoV-2, представляет собой неоценимый ресурс для отслеживания и расшифровки развития пандемии COVID-19 (рис. 1).

В течение первого года присутствия SARS-CoV-2 в человеческой популяции не было обнаружено нуклеотидных замен в его геноме, которые могли бы значительно изменить свойства патогена. Однако, поскольку сохранение возбудителя в качестве биологического вида невозможно без эволюционного развития, началось увеличение

гетерогенности популяции коронавируса за счёт циркуляции различных вариантов с последующим отбором и формированием эпидемического варианта возбудителя. Динамический мониторинг мутационной изменчивости циркулирующих коронавирусов стартовал в России с декабря 2020 г. В этот период был обнаружен геновариант, изначально известный как «британский», который позднее был переименован в Alpha (B.1.1.7) согласно решению ВОЗ отказаться от использования названий стран для обозначения штаммов. Среди обнаруженных мутаций в гене S-белка наиболее значимыми оказались N501Y, P681H и Δ69–70, которые влияют на трансмиссивность вируса и его способность инфицировать клетки, а также уклоняться от иммунного ответа. Обнаружение варианта Alpha в России совпало с ростом числа заболевших в конце 2020 г. и в начале 2021 г. Позднее были идентифицированы варианты Beta (B.1.351), впервые обнаруженный в Южно-Африканской Республике, и Gamma (P.1), выявленный в Бразилии, которые не получили широкого распространения в России, составляя лишь небольшой процент от общего числа новых случаев. Геновариант Alpha распространился по территории России зимой 2021 г., а летом 2021 г. появился новый вариант — Delta (B.1.617.2), который сопровождался значительным ростом числа заболевших и госпитализированных больных, тяжёлым течением коронавирусной инфекции, высокими показателями летальности. Геновариант Delta превалировал на территории России с мая по декабрь 2021 г., его доля среди выявленных вариантов приближалась к

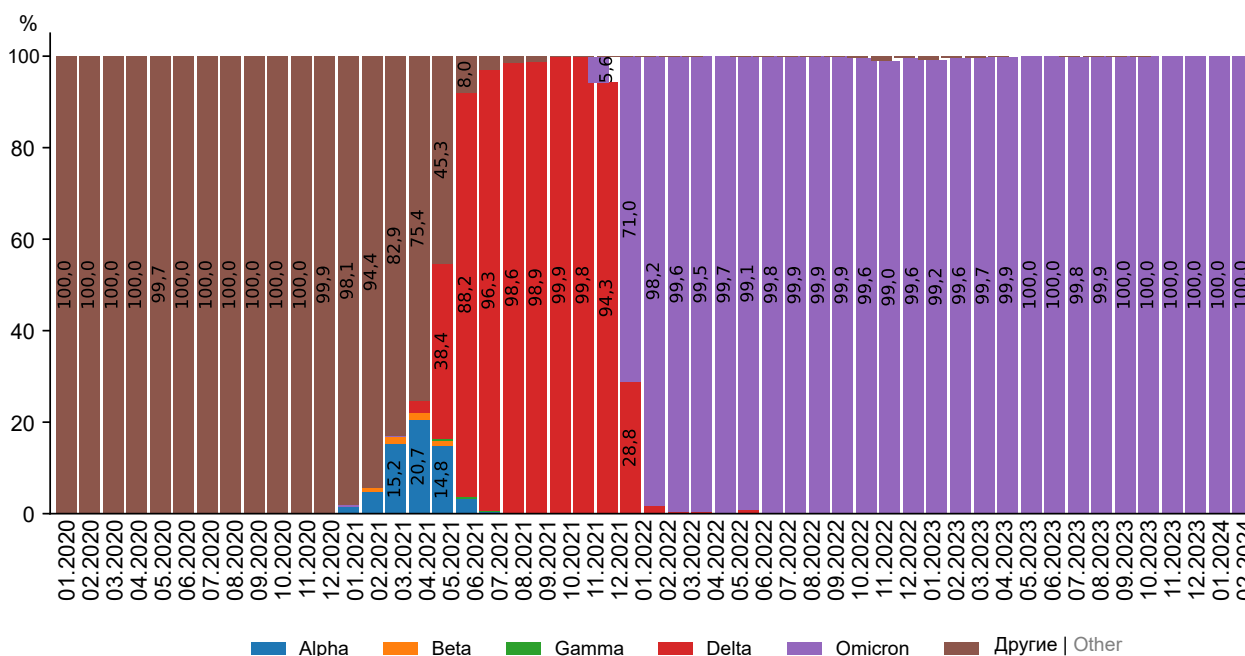


Рис. 1. Динамика геновариантов SARS-CoV-2 на территории России за 2020–2024 гг. Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 1. Dynamics of SARS-CoV-2 genetic variants in Russia in 2020–2024. For a color version of the figure, see the journal's website.

100%. Доминирующим во все месяцы наблюдения с момента начала регистрации геноварианта Delta являлся вариант, которому с 26.11.2021 классификатор Pangolin присвоил название AY.122 (83,3%). Всего на территории России выделено более 400 сублиний геноварианта Delta.

Процесс изменения биологических свойств вируса SARS-CoV-2 с последующей сменой преобладающих геновариантов связан с эволюцией вируса и становлением его эпидемического варианта при закономерном изменении иммунологической структуры популяции человека в цепи циркуляции возбудителя. В результате изменения в популяции вируса SARS-CoV-2 при циркуляции геноварианта Delta (повышение вирулентности, увеличение численности) произошёл новый подъём заболеваемости среди населения. С точки зрения теории о саморегуляции паразитарных систем, процесс из фазы резервации перешел в фазу эпидемического преобразования, а затем и эпидемического распространения. Изменение генетических свойств вируса привело к изменению его патогенности и, как следствие, оказало влияние на тяжесть клинического течения заболевания и характеристику (показатели) проявлений эпидемического процесса.

В результате взаимодействия популяций возбудителя и человека с учётом их неоднородности (гетерогенности) в конце 2021 г. был выявлен новый вариант коронавируса SARS-CoV-2, впервые идентифицированный в Ботсване и Южно-Африканской Республике, которому ВОЗ присвоила

название Omicron (B.1.1.529 по классификации PANGO). Вариант Omicron начал стремительно распространяться с декабря 2021 г. и в настоящее время полностью доминирует на территории России (100% исследованных образцов). Анализ данных VGARus позволил выявить диссоциацию генетической линии Omicron на территории России с наибольшей частотой циркуляции субвариантов BA.1 (54,5%), BA.1.1 (21,6%) и BA.2 (23,8%).

Весной 2022 г. был период эпидемиологического благополучия, характеризовавшийся низким уровнем заболеваемости COVID-19. Однако появление субвариантов Omicron BA.4 и особенно BA.5 привело к подъёму заболеваемости, который продолжался до конца октября 2022 г. В конце 2022 г. и начале 2023 г. появились высокотрансмиссивные варианты, такие как BQ.1* (субвариант BA.5), что указывает на динамичный и сложный характер эволюции SARS-CoV-2. В начале 2023 г. наблюдалось возрождение «новых форм старых штаммов», включая Omicron BA.2, который вернулся в виде рекомбинантных форм XBB*, доминирующих в течение большей части 2023 г. Внутри линии XBB появились собственные «лидеры», такие как XBB.1.5 (Kraken), XBB.1.16 (Arcturus), XBB.1.9.2.1 (EG.5, Eris). Появление последнего совпало с началом роста заболеваемости в стране в сентябре 2023 г.

В конце августа 2022 г. в Дании и Израиле был впервые обнаружен новый вариант SARS-CoV-2 — BA.2.86 (Pirola), который имел множество дополнительных мутаций по сравнению с предыдущими ва-

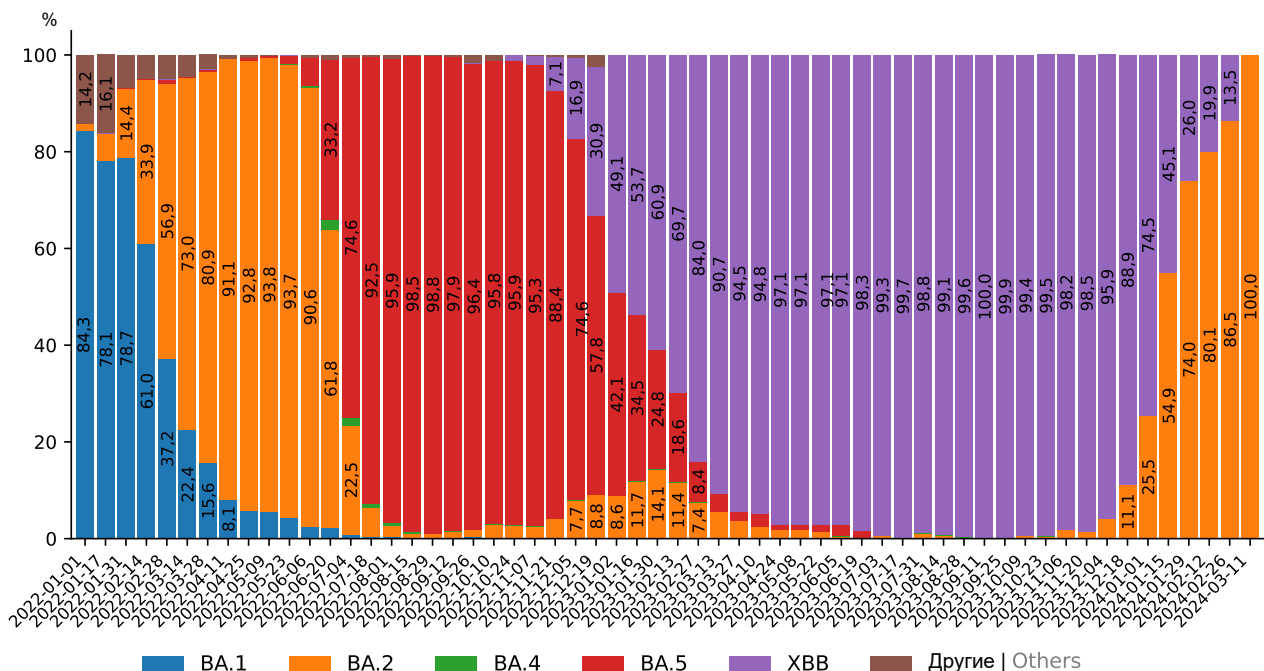


Рис. 2. Динамика геноварианта Omicron на территории России за 2022–2024 гг.

Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 2. Dynamics of Omicron genetic variant in Russia in 2022–2024.

For a color version of the figure, see the journal's website.

риантами Omicron. Однако он не являлся причиной роста заболеваемости во многих странах, т.к. сам рост начался раньше, чем активное распространение этого геноварианта. Первые случаи заражения ВА.2.86 были впервые выявлены в России в начале ноября 2023 г., и дальнейшее распространение ВА.2.86 могло несколько продлить стадию подъёма, в том числе в январе–феврале 2024 г., когда начал активно распространяться субвариант ВА.2.86 JN.1, ставший доминирующим как в России, так и практически во всех других странах. Всего же на территории России зарегистрировано более 600 различных сублиний Omicron, хотя это число может варьироваться в зависимости от определения сублинии (рис. 2).

SARS-CoV-2 эволюционировал, и геномные изменения привели к появлению таких характеристик, как более интенсивная передача вируса, изменение клинической симптоматики заболевания, уклонение от иммунного ответа, устойчивость к лекарственным препаратам. Фазовая самоперестройка популяции возбудителя во время появления геноварианта Omicron привела к уменьшению его вирулентности, что сопровождалось снижением тяжести заболеваний, числа госпитализированных и умерших больных, что может свидетельствовать о фазе резервационного преобразования в соответствии с теорией саморегуляции паразитарных систем. Сохранение возбудителя как биологического вида невозможно без эволюционного развития, чему способствует нестабильность генома и мутации, а также расширение диапазона гетерогенности популяции вируса SARS-CoV-2 за счёт циркуляции как мало-, так и высоко-вирулентных вариантов с последующим стабилизирующим отбором и становлением эпидемического варианта возбудителя. Поэтому фаза резервации всегда балансирует на грани с фазой эпидемического преобразования, когда появляются и получают преимущество в естественном отборе новые штаммы, способные обходить ранее сформированную человеческой популяцией защиту, ускользая от вакцин и постинфекционного иммунитета.

Значение геномного эпидемиологического надзора

Проведение молекулярно-генетического мониторинга позволяет на основе более детального изучения генетических характеристик возбудителей предвидеть изменения фенотипических свойств, влияющих на показатели проявлений эпидемического процесса и социально-экономические последствия таких изменений.

Важно отметить, что в конце 2023 г. в мире объём геномного секвенирования сократился, и это может привести к появлению новых вариантов без их обнаружения на протяжении длительного времени. Накоплен значительный объём данных об

эволюционных изменениях генома SARS-CoV-2 с учётом новых эпидемиологических свойств. Мониторинг и геномное секвенирование вируса важны для выявления новых геновариантов и разработки стратегий общественного здравоохранения.

Геномное секвенирование всё шире используется для сбора данных о других патогенах, исследования вспышек тяжёлых инфекционных заболеваний (холеры, лихорадок Эбола и денге, бактериального менингита, полиомиелита и др.), которые могут привести к возникновению чрезвычайных ситуаций в сфере здравоохранения, а также для оказания неотложной медицинской помощи в случае возникновения критических ситуаций эпидемиологического характера. Например, Глобальная система эпидемиологического надзора за гриппом и принятия ответных мер (GISRS) на постоянной основе использует геномное секвенирование в качестве неотъемлемой части комплекса мер реагирования на вспышки зоонозного гриппа и обеспечения готовности к пандемии, а также для сезонного наблюдения за гриппом с целью разработки рекомендаций по созданию сезонной вакцины и мониторинга восприимчивости к противовирусным препаратам. GISRS была использована для включения вируса SARS-CoV-2 в системы дозорного эпидемиологического надзора за гриппоподобными заболеваниями, острыми респираторными инфекциями и тяжёлыми острыми респираторными инфекциями с целью сбора данных для разработки национальной политики стран в отношении пандемии COVID-19 и принятия соответствующих мер реагирования¹.

На состоявшейся 30.05.2021 74-й Сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения государства — члены ВОЗ призвали усилить роль геномного эпидемиологического надзора в системе мер по обеспечению готовности и реагирования в чрезвычайных ситуациях, однако существуют проблемы, связанные с отсутствием необходимого потенциала и соответствующей инфраструктуры для проведения лабораторных исследований. Только две трети стран, включая Россию, располагают возможностями для проведения геномного секвенирования и занимаются обеспечением регулярного использования этой мощной технологии, остальные страны только создают системы геномного эпидемиологического надзора за возбудителями с эпидемическим потенциалом [21].

Стратегия эпидемиологического надзора на 2022–2032 г., разработанная ВОЗ с учётом предыдущего опыта и уроков пандемии COVID-19, делает ставку на особую роль геномики в системе об-

¹ WHO. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). URL: <https://who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system> (дата обращения: 31.01.2024).

публичного здравоохранения, которую она играет благодаря возможности использования результатов геномных исследований в различных областях медицины. Стратегия не ограничивается каким-либо одним возбудителем болезни или конкретной эпидемиологической угрозой. Её целью, скорее, является выработка единой концепции использования геномики в качестве мощного дополнительного инструмента для решения задач общественного здравоохранения по обеспечению готовности и осуществлению мер реагирования на пандемии и эпидемии самого широкого спектра.

Заключение

В рамках новой Глобальной стратегии геномного эпидемиологического надзора за возбудителями болезней, обладающих пандемическим и эпидемическим потенциалом, отмечено, что геномный эпидемиологический надзор существенным образом меняет работу системы здравоохранения, обеспечивая более глубокое понимание природы, эволюции и путей циркуляции возбудителей инфекционных заболеваний. Геномные данные о возбудителях болезней, обладающих пандемическим и эпидемическим потенциалом, в сочетании с клиническими, эпидемиологическими и другими данными используются для оценки риска, разработки вакцин, лекарств и диагностических тестов, а также для принятия решений по мерам эпидемиологического и социального контроля за распространением инфекции. Новые технологии в области секвенирования и биоинформатики, появившиеся за последние годы, позволили ряду стран добиться значительного прогресса в создании и укреплении своих возможностей в этом направлении.

Целью геномного эпидемиологического надзора является управление эпидемическим процессом на основе системных данных об изменении генетических свойств возбудителей инфекций, обладающих значительным эпидемическим (пандемическим) потенциалом.

Задачи геномного эпидемиологического надзора:

1. Оперативный и ретроспективный анализ изменений генетических свойств циркулирующих и возникающих вариантов патогенов, позволяющий динамически отслеживать смену доминирующих геновариантов.

2. Оценка влияния структуры циркулирующих возбудителей с учётом особенностей территориального распространения на характеристики эпидемического процесса.

3. Выявление предикторов неблагоприятного развития эпидемиологической ситуации на основе молекулярно-генетического мониторинга.

4. Прогнозирование развития эпидемического процесса инфекционных болезней на основе зна-

ний об изменении генетических свойств возбудителя с использованием инновационных платформенных решений и применения цифровых технологий.

5. Поиск и прогноз появления новых патогенов человека и животных.

6. Разработка мер оперативного реагирования на вновь возникающие инфекции, обусловленные эпидемическим и пандемическим потенциалом.

7. Управление эпидемическим процессом на основе разработки осуществления и корректировки системы профилактических и противоэпидемических мероприятий.

8. Создание инновационных вакцинных и лекарственных препаратов.

Принимая во внимание вышесказанное, Россия сделала значительный шаг вперёд в развитии данного научного направления. Геномный эпидемиологический надзор — качественно новый уровень осуществления эпидемиологического надзора с учётом возможностей исследования генетических свойств возбудителей инфекционных болезней.

Таким образом, геномный эпидемиологический надзор, базирующийся на знаниях о молекулярно-генетических свойствах возбудителей инфекционных болезней, является важнейшей составляющей биобезопасности Российской Федерации и стратегическим направлением научно-технологического развития².

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. 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(3):269–86. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Ploskireva A.A., et al. COVID-19: the evolution of the pandemic in Russia. Report I: Manifestations of the COVID-19 epidemic process. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(3):269–86. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276> EDN: <https://elibrary.ru/zxgtfd>
2. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Колосовская Е.Н. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):497–511. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Kolosovskaya E.N., et al. Assessment of the COVID-19 epidemiological situation in St. Petersburg. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(5):497–511. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-154> EDN: <https://elibrary.ru/dtmnhz>
3. Семенов Т.А. Роль банка сывороток крови в системе биологической безопасности страны. *Вестник Росздравнадзора*. 2010;(3):55–8. Semenov T.A. The role of the blood serum bank in the biological safety system of the country. *Bulletin of Roszdravnadzor*. 2010;(3):55–8. EDN: <https://elibrary.ru/muutej>

² Указ Президента Российской Федерации от 28.02.2024 № 145 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации».

4. Громашевский Л.В. *Общая эпидемиология*. М.;1965. Gromashevskii L.V. *General Epidemiology*. Moscow;1965.
5. Павловский Е.Н. *Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов*. М.;1964. Pavlovskii E.N. *Natural foci of Vector-Borne Diseases in Connection with the Landscape Epidemiology of Zoonthroposes*. Moscow;1964. EDN: <https://elibrary.ru/zgmuqp>
6. Черкасский Б.Л. Теоретическое обоснование структуры эпидемиологического надзора. В кн.: Покровский В.И., ред. *Эпидемиологический надзор за инфекционными болезнями*. М.;1987. Cherkasskii B.L. Theoretical substantiation of the structure of epidemiological surveillance. In: Pokrovskii V.I., ed. *Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases*. Moscow;1987.
7. Покровский В.И. Пути оптимизации эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в стране. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1986;63(11):3–7. Pokrovskii V.I. Ways to optimize epidemiological surveillance of infectious diseases in the country. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1986;63(11):3–7. EDN: <https://elibrary.ru/pioohv>
8. Беляков В.Д. Общие закономерности функционирования паразитарных систем (механизмы саморегуляции). *Паразитология*. 1986;20(4):249–55. Belyakov V.D. General patterns of functioning of parasitic systems (mechanisms of self-regulation). *Parasitology*. 1986;20(4):249–55.
9. Беляков В.Д. Эпидемиологический надзор – основа современной организации противоэпидемической работы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1985;62(5):53–8. Belyakov V.D. Epidemiological surveillance is the basis of modern organization of anti-epidemic work. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1985;62(5):53–8. EDN: <https://elibrary.ru/zfxutr>
10. WHO. *Strengthening Population Health Surveillance: A Tool for Selecting Indicators to Signal and Monitor the Wider Effects of the COVID-19 Pandemic*. Copenhagen; 2021.
11. Фельдблюм И.В. Эпидемиологический надзор за вакцинопрофилактикой. *Журнал МедиАль*. 2014;(3):37–55. Fel'dblyum I.V. Epidemiologic surveillance over preventive vaccination. *Medial Journal*. 2014;(3):37–55. EDN: <https://elibrary.ru/sxhknx>
12. Попова А.Ю., Акимкин В.Г., ред. *Материалы XII Съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов*. М.;2022. Popova A.Yu., Akimkin V.G., eds. *Proceedings of the XII Congress of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists*. Moscow;2022. DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-6048873-1-8> EDN: <https://elibrary.ru/nrlneo>
13. Стародубов В.И., Береговых В.В., Акимкин В.Г. и др. COVID-19 в России: эволюция взглядов на пандемию (часть 1). *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2022;77(3):199–207. Starodubov V.I., Beregovykh V.V., Akimkin V.G., et al. COVID-19 in Russia: evolution of views on the pandemic. Report I. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(3):199–207. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn2118> EDN: <https://elibrary.ru/sqglyh>
14. 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 иммунологии*. 2022;99(4):381–96. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Khafizov K.F., et al. COVID-19: the 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>
15. 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>
16. Акимкин В.Г., Семенов 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., Semenenko 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>
17. Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Углева С.В., et al. COVID-19 epidemic process and evolution of SARS-CoV-2 genetic variants in the Russian Federation. *Microbiol. Res*. 2024;15(1):213–24. DOI: <https://doi.org/10.3390/microbiolres15010015>
18. Стародубов В.И., Береговых В.В., Акимкин В.Г. и др. COVID-19 в России: эволюция взглядов на пандемию. Сообщение 2. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2022;77(4):291–306. Starodubov V.I., Beregovykh V.V., Akimkin V.G., et al. COVID-19 in Russia: evolution of views on the pandemic. Report II. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(4):291–306. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn2122> EDN: <https://elibrary.ru/ojjdra>
19. Акимкин В.Г. Эпидемиология и диагностика COVID-19. Мониторинг эволюционных изменений вируса SARS-CoV-2. *Вестник Российской академии наук*. 2022;92(7):647–53. Akimkin V.G. COVID-19 epidemiology and diagnosis: monitoring evolutionary changes in the SARS-COV-2 virus. *Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2022;92(7):647–53. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869587322070027> EDN: <https://elibrary.ru/nrfrlg>
20. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В. и др. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. *Вопросы вирусологии*. 2021;66(1):17–28. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovitev K.V., et al. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Problems of Virology*. 2021;66(1):17–28. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42> EDN: <https://elibrary.ru/uklaki>
21. Carter L.L., Yu M.A., Sacks J.A., et al. Global genomic surveillance strategy for pathogens with pandemic and epidemic potential, 2022–2032. *Bull. World Health Organ*. 2022;100(4):239–A. DOI: <https://doi.org/10.2471/blt.22.288220>

Информация об авторах

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

Семеновна Татьяна Анатольевна — д.м.н., профессор, рук. отдела эпидемиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Хафизов Камил Фаридович — PhD, зав. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Углева Светлана Викторовна[✉] — д.м.н., доцент, руководитель научно-аналитического отдела ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, uglevas@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1322-0155>

Дубоделов Дмитрий Васильевич — к.м.н., с.н.с. лаб. вирусных гепатитов отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3093-5731>

Колосовская Елена Николаевна — д.м.н., профессор каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6667-2377>

Участие авторов: *Акимкин В.Г.* — разработка концепции геномного эпидемиологического надзора, разработка концепции VGARus, разработка концепции статьи; *Семеновна Т.А.* — разработка концепции статьи, написание статьи; *Хафизов К.Ф.* — разработка VGARus, биоинформатический анализ; *Дубоделов Д.В.* — разработка VGARus, разработка аналитической платформы для эпидемиологического анализа; *Углева С.В.* — разработка концепции статьи, написание и редактирование статьи, работа с редакцией журнала; *Колосовская Е.Н.* — разработка концепции статьи, написание статьи. 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 04.03.2024;
принята к публикации 18.04.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Prof., Full Member of RAS, Director, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Tatyana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

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

Svetlana V. Ugleva[✉] — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Scientific and analytical department, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, uglevas@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1322-0155>

Dmitry V. Dubodelov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of viral hepatitis, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3093-5731>

Elena N. Kolosovskaya — D. Sci. (Med.), Professor, Department of epidemiology, parasitology and disinfectology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6667-2377>

Author contribution: *Akimkin V.G.* — development of the concept of genomic epidemiological surveillance, development of the VGARus concept, development of the concept of the article; *Seenenko T.A.* — developing the concept of the article, writing the article; *Khafizov K.F.* — development of VGARus, bioinformatics analysis; *Dubodelov D.V.* — development of VGARus, development of an analytical platform for epidemiological analysis; *Ugleva S.V.* — developing the concept of the article, writing and editing the article, working with the editors of the journal; *Kolosovskaya E.N.* — developing the concept of the article, writing the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 04.03.2024;
accepted for publication 18.04.2024;
published 29.04.2024



Влияние инновационного антибактериального препарата класса тиадiazинонов на факторы вирулентности бактерий филума *Pseudomonadota*, хронически инфицирующих больных муковисцидозом

Воронина О.Л.^{1✉}, Королева Е.А.¹, Кунда М.С.¹, Рыжова Н.Н.¹, Аксенова Е.И.¹, Капотина Л.Н.¹, Нелюбина С.А.¹, Лазарева А.В.², Зигангирова Н.А.¹

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

²Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Инфекции нижних дыхательных путей бактериями филума *Pseudomonadota*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp. критичны в отношении качества и продолжительности жизни больных муковисцидозом (МВ). При хронизации инфекции эрадикация бактерий существующими антибактериальными препаратами практически невозможна. Для исследования препаратов альтернативного действия необходимы испытания, проведённые на бактериях, выделенных от пациентов с МВ и охарактеризованных с помощью геномных подходов.

Целями нашего исследования были сравнительный анализ факторов вирулентности 6 изолятов бактерий филума *Pseudomonadota* и проверка эффективности инновационного препарата фтортиазинон (ФТ) в подавлении патогенности бактерий *in vitro*.

Материалы и методы. Изоляты *A. ruhlandii* ST36, *A. xylosoxidans* ST555, *B. cepacia* ST2140, *B. gladioli* ST2141, *P. aeruginosa* ST859 и ST198 исследовали с помощью полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа для поиска детерминант резистентности и вирулентности. ФТ испытали по действию на бактерии в экспериментах *in vitro* по цитотоксичности на клетках HeLa, подвижности и формированию биоплёнок.

Результаты. Геномные исследования подтвердили арсенал детерминант резистентности, особенно систем эффлюкса бактерий, полученных от пациентов с МВ, и разнообразие факторов вирулентности, среди которых мы выделили факторы в категориях: подвижность, сигналы систем quorum-sensing, системы секреции, экзотоксины как наиболее существенные для адаптации бактерий к условиям нижних дыхательных путей. Испытания ФТ *in vitro* показали его эффективность в подавлении цитотоксичности (в 2,6–4,0 раза), подвижности (в 2,0–3,6 раза) и процесса формирования биоплёнок (в 2,0–7,7 раза).

Заключение. Впервые показано эффективное действие инновационного антибактериального препарата ФТ на бактерии филума *Pseudomonadota*, выделенные от хронически инфицированных пациентов с МВ, с описанным потенциалом факторов вирулентности.

Ключевые слова: факторы адгезии микроорганизмов, *Pseudomonadota*, муковисцидоз, полногеномное секвенирование, факторы вирулентности, фтортиазинон, антивирулентность

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 59 от 08.09.2023).

Благодарность. Авторы признательны Е.М. Бурмистрову за содействие в выделении *P. aeruginosa* из мокроты пациентов с МВ.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

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

Для цитирования: Воронина О.Л., Королева Е.А., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Капотина Л.Н., Нелюбина С.А., Лазарева А.В., Зигангирова Н.А. Влияние инновационного антибактериального препарата класса тиадiazинонов на факторы вирулентности бактерий филума *Pseudomonadota*, хронически инфицирующих больных муковисцидозом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):173–183.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-499>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-499>

The influence of an innovative antibacterial drug of the thiadiazinone class on the virulence factors of bacteria of the phylum *Pseudomonadota*, which chronically infect patients with cystic fibrosis

Olga L. Voronina¹✉, Ekaterina A. Koroleva¹, Marina S. Kunda¹, Natalia N. Ryzhova¹, Ekaterina I. Aksenova¹, Lidia N. Kapotina¹, Stanislava A. Nelyubina¹, Anna V. Lazareva², Nailya A. Zigangirova¹

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

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

Abstract

Introduction. Infections of the lower respiratory tract by bacteria of the *Pseudomonadota* phylum: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp. are critical to the quality and life expectancy of patients with cystic fibrosis (CF). When the infection is chronic, eradication of bacteria with existing antibacterial drugs is practically impossible. To explore alternative drugs, trials are needed on bacteria isolated from CF patients and characterized using genomic approaches.

The objective of our study was a comparative analysis of virulence factors of 6 isolates of bacteria of the *Pseudomonadota* phylum and testing the efficacy of the innovative drug Fluorothiazinone (FT) in suppressing the pathogenicity of bacteria *in vitro*.

Materials and methods. Isolates of *A. ruhlandii* ST36, *A. xylosoxidans* ST555, *B. cepacia* ST2140, *B. gladioli* ST2141, *P. aeruginosa* ST859 and ST198 were examined using whole-genome sequencing and bioinformatics analysis to search for resistance and virulence determinants. The FT drug was tested for its effect on bacteria in *in vitro* experiments on cytotoxicity on HeLa cells, motility and biofilm formation.

Results. Genomic studies have confirmed the arsenal of resistance determinants, especially the efflux systems of bacteria isolated from patients with CF, and the diversity of virulence factors, among which we identified factors in the categories of motility, signals of quorum-sensing systems, secretion systems, exotoxins, as the most essential for the adaptation of bacteria to conditions of the lower respiratory tract. *In vitro* tests of the FT drug showed its effectiveness in suppressing cytotoxicity (2.6–4.0 times), motility (2.0–3.6 times) and the process of biofilm formation (2.0–7.7 times).

Conclusion. For the first time, the effectiveness of the innovative antibacterial drug Fluorothiazinone has been shown against bacteria of the *Pseudomonadota* phylum, isolated from chronically infected patients with CF, with the described potential of virulence factors.

Keywords: *microbial adhesion factors, Pseudomonadota, Cystic Fibrosis, WGS, virulence, Fluorothiazinone, anti-virulence*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 59, September 8, 2023).

Acknowledgement. The authors are grateful to E.M. Burmistrov for assistance in the isolation of *P. aeruginosa* from sputum of CF patients.

Funding source. The study was carried out with the financial support of the State assignment of N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology.

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

For citation: Voronina O.L., Koroleva E.A., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kapotina L.N., Nelyubina S.A., Lazareva A.V., Zigangirova N.A. The influence of an innovative antibacterial drug of the thiadiazinone class on the virulence factors of bacteria of the phylum *Pseudomonadota*, which chronically infect patients with cystic fibrosis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):173–183.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-499>
EDN: <https://www.elibrary.ru/pmwtsz>

Введение

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее распространённых аутосомно-рецессивных заболеваний, при котором мутации в гене трансмембранного регулятора хлорного канала обуславливают

нарушения мукоцилиарного клиренса и развитие хронической колонизации респираторного тракта бактериями филума *Pseudomonadota*. Микроорганизмы этого филума — *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp. — характери-

зуются высокой природной резистентностью к антимикробным препаратам. Несмотря на применение агрессивной антибиотикотерапии, у пациентов с МВ с возрастом наблюдаются прогрессирующее снижение функции лёгких и ранняя смертность. По данным последнего издания российского регистра больных МВ, доля пациентов, хронически инфицированных перечисленными бактериями, составляет 33,6% для *P. aeruginosa*, 7,6% для *Achromobacter* spp. и 5,5% для *Burkholderia* spp. [1].

Проникая при аспирации в нижние дыхательные пути, бактерии перемещаются по поверхности эпителиоцитов, используя флагеллу и пили/фимбри; эти же структуры служат адгезинами при прикреплении к клеткам для начала формирования биоплёнок [2]. Далее возможны несколько путей миграции бактерий указанных родов: транслокация через межклеточные контакты и трансэпителиальная миграция [3]. В последнем случае сначала осуществляется инвазия посредством систем секреции 3-го и 6-го типов (Т3SS, Т6SS). Бактерии, вышедшие из эпителиоцитов, затем преодолевают базальную мембрану и достигают клеток соединительной ткани. На этом пути их защищают экзотоксины, воздействующие на коллаген и препятствующие его противомикробной активности [4]. *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. и *Burkholderia* spp. могут осуществлять инвазию в макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки, таким образом имея возможность быть защищёнными от внешних воздействий в 4 типах эукариотических клеток. Бактерии не только выживают внутри клеток, но и могут нарушать их нормальное функционирование, приводя к пироптозу/апоптозу или некрозу [5]. Смерть клеток, выход бактерий, их дальнейшее размножение вызывают воспалительный ответ, повреждающий ткани лёгкого [3]. Все перечисленные этапы жизненного цикла патогенных микроорганизмов координируют сигналы системы Quorum-Sensing (QS) [6]. Механизмы выживания помогают этим бактериям конкурировать друг с другом и с другими представителями микробиома лёгких, поэтому микробное разнообразие при таких инфекциях становится минимальным [7].

Для эрадикации столь успешных патогенов требуются новые подходы, один из которых был использован при разработке инновационного антибактериального препарата класса тиадиазинов (фтортиазинов, ФТ) в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Эффекторы Т3SS [8], а также, предположительно, высококонсервативные АТФазы аппарата флагелл и Т3SS стали мишенью для воздействия ФТ, подавляющего патогенность бактерий, но не убивающего их [8, 9], что обеспечивает отсутствие развития устойчивости к такому препарату. Эффективность ФТ *in vitro* и на моделях животных показана в отношении ряда грамотрицательных бактерий: *Salmonella enterica*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*

baumannii и *Klebsiella pneumoniae* [10]. Препарат ингибировал облигатный внутриклеточный патоген *Chlamydia trachomatis* [11], доказывая возможность проникновения ФТ в эукариотические клетки.

Ранее при изучении изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из мокроты и трахеального аспирата больных МВ, мы показали, что условия тестирования цитотоксичности, подобранные для культур, выделенных при внутрибольничных инфекциях [9], были оптимальны только для изолятов генотипов ST235 и ST313 [12], характерных для нозокомиальных *P. aeruginosa*, относящихся к EхoU-линии, получившей название по эффектору Т3SS [13]. Остальные изоляты отличались медленным ростом *in vitro* в силу изменения физиологии клетки при хронической инфекции лёгких. Адаптация условий экспериментов к особенностям *Pseudomonadota* пациентов с МВ была одной из задач исследования.

Учитывая разнообразие факторов вирулентности бактерий, используемых при адаптации и персистенции в респираторном тракте пациентов с МВ, мы изучили геномные характеристики изолятов, выбранных для оценки действия ФТ, и сравнили факторы в категориях: подвижность, сигналы систем QS, системы секреции, экзотоксины у выбранных представителей *P. aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp.

Целями нашего исследования стали сравнительный анализ факторов вирулентности 6 изолятов бактерий филума *Pseudomonadota*, инфицировавших нижние дыхательные пути пациентов с МВ, и проверка эффективности инновационного препарата ФТ в подавлении патогенности бактерий *in vitro*.

Материалы и методы

Материалы

Из мокроты хронически инфицированных пациентов с МВ выделили 6 культур бактерий филума *Pseudomonadota* (табл. 1). Исследование проводилось на условиях получения добровольного информированного согласия пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 59 от 08.09.2023).

ФТ — инновационный антибактериальный препарат класса тиадиазинов $C_{19}H_{17}F_2N_3O_4S$: N-(2,4-дифторфенил)-4(3-этокси-4-гидроксibenзил)-5-оксо-5,6-дигидро-4Н-[1,3,4]-тиадиазин-2-карбоксамид¹. Из субстанции готовили стоковый раствор ФТ с концентрацией 5,0 мМ в 0,3 М CH_3COONa , pH $7,0 \pm 0,2$.

¹ Клинические исследования: РКИ № 389 от 03.08.2018 (завершено); РКИ 169 от 14.03.2022 (продолжается). Заявление на регистрацию в МЗ РФ (входящий № 4253550 от 30.05.2023). Статус на рассмотрении.

Таблица 1. Изоляты филума *Pseudomonadota*, использованные в исследовании**Table 1.** Isolates of the *Pseudomonadota* phylum used in the study

Вид Specie	Изолят Isolate	Assembly accession Accession number	Сиквенс-тип Sequence type	Размер генома, Mb Genome size, Mb	Гены Genes	Рамки, кодирующие белки Protein-coding
<i>P. aeruginosa</i>	GIMC5045:PA33P25	JAVMRC000000000	ST859	6,4	5973	5841
<i>P. aeruginosa</i>	GIMC5047:PA33P30	JAVMRD000000000	ST198	6,4	6023	5842
<i>B. cepacia</i>	SCCH90:Bcn202840	JAQOTY000000000	ST2140	8,4	7704	7512
<i>B. gladioli</i>	SCCH61:Bgd92-3601	JAQOTZ000000000	ST2141	8,2	9105	8385
<i>A. ruhlandii</i>	SCCH137:Ach2231057	JAQZZN000000000	ST36	6,3	5884	5679
<i>A. xylosoxidans</i>	SCCH131:Ach223717	JAPZVF000000000	ST555	6,4	5912	5806

Цитотоксичность изучали на клетках карциномы шейки матки HeLa (ATCC CCL2, 22603).

Культивирование бактерий

Бактерии выращивали 18 ч при 37°C в бульоне LB до концентрации 10⁹ микробных клеток/мл (оптическая плотность при λ = 600 нм).

Геномный анализ

Для выделения ДНК из изолятов использовали протокол [14], дополнив этап очистки от полисахаридов с помощью СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide).

Библиотеки ДНК готовили по протоколам «Nextera DNA Flex Library Prep» («Illumina») и «KAPA HyperPlus Kit» («Roche»). Секвенирование выполняли на приборе «NextSeq 500/550» («Illumina»), используя картридж «Mid Output 300 cycles».

Геномы собирали с помощью «CLC Genomic Workbench v. 21.0.1» («Qiagen») и «SPAdes v. 3.13.0»². Для аннотации применяли Rapid Annotations Subsystems Technology (RAST) [15] и NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [16]. Результаты депонировали в GenBank (биопроект PRJNA561493) под номерами, указанными в табл. 1.

Геномы анализировали с помощью ресурсов BV-BRC³ [17]. Факторы вирулентности исследовали с помощью VFDB⁴ [18] и BlastKOALA⁵ [19]. Поиск плазмид осуществляли с помощью PlasmidFinder 2.1⁶. Для выявления детерминант резистентности использовали CARD⁷ [20], BV-BRC [17] и BlastKOALA [19].

Исследование влияния ФТ in vitro

Цитотоксичность бактерий определяли согласно методике [9], с модификациями. Монослой клеток HeLa, выращенный в среде IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) с добавлением 10% FBS (fetal bovine serum) и 2 мМ L-глутамин в 96-луночных планшетах, промывали и добавляли IMDM, содержащую 1% FBS. Клетки HeLa заражали бактериальными культурами при начальной множественности инфекции (MOI), равной 5. Планшеты инкубировали 18 ч в присутствии ФТ (60 мкг/мл). В качестве контроля использовали 0,3М CH₃COONa, pH 7,0 ± 0,2. Клетки осаждали центрифугированием 20 мин при 1500 rpm. В супернатантах определяли активность высвобождающейся лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью набора «CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit» («Promega») согласно протоколу производителя. Процент высвобождения ЛДГ рассчитывали относительно неинфицированного контроля (0% высвобождения ЛДГ) и клеток HeLa, лизированных тритоном X-100 (100% высвобождения ЛДГ).

Способность ФТ ингибировать плавательную подвижность изолятов оценивали на чашках Петри с 0,3% полужидким агаром [21]. Бактериальные культуры инкубировали с ФТ (100 мкг/мл) 3 ч при 37°C, затем по 2 мкл суспензии вносили в толщу полужидкого агара, содержащего ФТ (100 мкг/мл), и инкубировали 48 ч при 37°C. Степень подвижности бактерий определяли по диаметру радиальной миграции в агаре.

Для исследования влияния ФТ на образование бактериальной биоплёнки использовали следующий подход. На абиотической поверхности формировали статические биоплёнки по протоколу [22] с изменениями в условиях инкубации. ФТ (100 мкг/мл) добавляли в ночные бактериальные культуры с концентрацией 10⁷ микробных клеток/мл (OD₆₀₀) и инкубировали в лунках планшета 48 ч без замены среды, затем добавляли по 125 мкл 0,1% раствора кристаллического фиолетового (CV) для окрашивания биоплёнок. Связавшийся с биоплёнками краситель экстрагировали 100 мкл 96% этанола и

² St. Petersburg genome assembler, Russia.

URL: <http://cab.spbu.ru/software/spades>

³ Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center.

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

⁴ Virulence Factor Database. URL: <http://www.mgc.ac.cn/VFs>

⁵ KEGG Orthology and Links Annotation.

URL: <https://www.kegg.jp/blastkoala>

⁶ PlasmidFinder 2.1.

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

⁷ Comprehensive Antibiotic Resistance Database.

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

определяли оптическую плотность при $\lambda = 540$ нм на приборе «Multiskan EX» («Thermo Labsystems»). Качественные исследования биоплёнок выполняли под микроскопом «Nikon Eclipse 50i» («Nikon») при 20× увеличении.

Каждый эксперимент с ФТ повторяли 3 раза.

Статистическую обработку результатов анализа и визуализацию выполняли с помощью «Prism-GraphPad» («GraphPad Software»). Критерием статистической достоверности различия получаемых данных считали величину ошибки $p < 0,05$.

Результаты

Геномный анализ

Шесть изолятов филума *Pseudomonadota* представляли 3 рода. *A. ruhlandii* и *A. xylosoxidans*, выбранные для исследования, относились представителям рода, наиболее распространённым у пациентов с МВ в России. Выбор *B. cepacia* и *B. gladioli* определялся появлением новых видов *Burkholderia* spp., инфицирующих больных МВ на фоне сокращения распространения *B. cenocepacia* эпидемического генотипа ST709 [23]. *P. aeruginosa* разных генотипов, относящихся к EhoS-линии, согласно Е.А. Озер и соавт. [13], взяли в исследование как более распространённые при инфекциях пациентов с МВ по сравнению с EhoU-фенотипом [12, 24].

Геномы изолятов были представлены 1 хромосомой у *Achromobacter* и *Pseudomonas* и 3 хромосомами у *Burkholderia*. Конъюгативная плаزمид

48 Кб присутствовала только в геноме *A. ruhlandii* (IncP1), но не включала детерминант резистентности. Размер геномов *Burkholderia* на треть превышал геномы *Achromobacter* и *Pseudomonas* (табл. 1). Во всех геномах 92–98% выявленных генов кодируют белки.

При оценке потенциала резистентности исследуемых изолятов обратило на себя внимание количество эффлюксных систем, кодируемых геномами: по 12 у *P. aeruginosa*, по 16 — у *Achromobacter* spp., 27 — у *B. cepacia*, 38 — у *B. gladioli*, что создаёт дополнительные возможности для противодействия применяемой антибиотикотерапии.

Исследуя факторы вирулентности изолятов, мы сосредоточились на 4 основных группах, необходимых для адаптации бактерий к условиям нижних дыхательных путей: системы секреции, подвижности, токсины и сигналы системы QS.

Системы секреции (табл. 2) Sec, SRT, Tat и T2SS представлены в геномах изолятов всеми компонентами. T3SS обнаружены у всех изолятов, кроме *B. cepacia*; T6SS — у 5 изолятов, а у *A. ruhlandii* содержит только гены секретируемого субстрата Hcp и белка внутренней мембраны IcmF, наконец, полная T1SS есть у *B. gladioli*, а у остальных изолятов представлена только белком внешней мембраны TolC.

Основной аппарат подвижности — аппарат флагаелл — есть в геномах всех изолятов. Выявленные пили/фимбрии различались между изолятами по составу. Как видно из табл. 3, пили, отвечающие за подёргивающую подвижность и хе-

Таблица 2. Классы бактериальных систем секреции, представленные в геномах исследованных изолятов

Table 2. Classes of bacterial secretion systems represented in the genomes of the studied isolates

Классы бактериальных систем секреции белков Classes of bacterial protein secretion systems	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5045:PA33P25	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5047:PA33P30	<i>B. cepacia</i> SCCH90:Bcn202840	<i>B. gladioli</i> SCCH61:Bgd92-3601	<i>A. ruhlandii</i> SCCH137:Ach2231057	<i>A. xylosoxidans</i> SCCH131:Ach223717
Sec	+	+	+	+	+	+
SRT	+	+	+	+	+	+
Tat	+	+	+	+	+	+
T1SS	+ (TolC)	+ (TolC)	+ (TolC)	+ (TolC, HlyB, HlyD)	+ (TolC)	+ (TolC)
T2SS	+	+	+	+	+	+
T3SS	+	+		+	+	+
T4SS					+ VirD4	+ VirB5, VirB6
T6SS	+	+	+	+	+ Hcp, IcmF	+

Примечание. VirD4 — АТФаза; VirB5 — поверхностный или белок пилей; VirB6, IcmF — белки внутренней мембраны; Hcp — секретируемый субстрат.

Note. VirD4 — ATPase; VirB5 — surface/pilus protein; VirB6, IcmF — inner membrane protein; Hcp — secreted substrate.

Таблица 3. Системы пилей в геномах исследованных изолятов
Table 3. Pilus systems in the genomes of the studied isolates

Система пилей Pilus systems	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5045:PA33P25	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5047:PA33P30	<i>B. cepacia</i> SCCH90:Bcn202840	<i>B. gladioli</i> SCCH61:Bgd92-3601	<i>A. rhizandi</i> SCCH137:Ach2231057	<i>A. xylosoxidans</i> SCCH131:Ach223717
Пили, отвечающие за поддерживающую подвижность Twitching motility pili	<i>pilGHIJKRSTUKRS</i>	<i>pilGHIJKRSTUKRS</i>	-	-	-	-
Хемосенсорные пили Chemotensory pili	<i>chrABCDE</i>	<i>chrABCDE</i>	-	-	-	-
Пили IV типа Type IV pili	<i>pilABCDFFQPNMZVWXY1Y2E</i>	<i>pilABCDFFQPNMZVWXY1Y2E</i>	<i>pilABCDEQW</i>	<i>piIABCDEW</i>	<i>pilD</i>	<i>pilD</i>
Пили IVb типа Type IVb pili	<i>flp, cpaABCEf</i> <i>fimACD, cupE</i>	<i>flp, cpaABCEf</i> <i>fimACD, cupE</i>	<i>flp, cpaABCEf</i> <i>fimACD, cupE</i>	<i>flp, cpaABCEf</i> <i>fimAD</i>	<i>flp, cpaABCEf</i> <i>fimCD, cupE</i>	<i>flp, cpaABCEf</i> <i>fimCD, cupE</i>
Пили, в сборке которых участвуют белки-помощники: шаперон и ушер Chaperone-Usher Pathway (CUP) pili	-	-	-	-	-	-
Белки положительной фототаксической подвижности Positive phototactic motility proteins	-	-	-	-	<i>pixH</i>	-

Примечание. *pilD* — пептидаза препилина; *pixH* — регулятор ответа.

Note. *pilD* — prepilin peptidase; *pixH* — response regulator.

мосенсорику, обнаружены только в геномах *P. aeruginosa*. Пили IV типа есть у псевдомонад и *Burkholderia* spp., но отличаются перечнем компонентов, а у *Achromobacter* представлены только пептидазой препилина *pilD*. Пили IVb типа есть у всех изолятов. Шаперон-ушер пили, которые кодируют 2 разных оперона: *fimACD* и *cupE1-6*, есть у *P. aeruginosa* и *B. cepacia* с полным комплектом компонентов. У *B. gladioli* в опероне *fimACD* отсутствует ген шаперона и не обнаружен оперон *cupE*. В геномах *Achromobacter* присутствует полный оперон *cupE1-6*, а в опероне *fimACD* отсутствует ген, кодирующий пилин.

Система QS как важнейшее средство коммуникации бактерий в проанализированных геномах представлена во всём многообразии. QS типа AI-1 (AutoInductor), сигнальными молекулами которой являются производные гомосеринлактона, обнаружили в геномах *P. aeruginosa* (по 2) и *Burkholderia* (по 1). В этих геномах присутствует также регулируемый AI-1 оперон биосинтеза рамнолипидов. Рамнолипиды включены в систему QS, используются бактериальными клетками для снижения поверхностного натяжения, важны для подвижности, биоплёнокообразования, поглощения гидрофобных субстратов [25].

Вторая система получила название DSF от сигнальных молекул, которые являются диффузионными сигнальными факторами. Для буркхолдерий это BDSF — cys-2-додеценная кислота. Другое название — *rpff/R/B/G* — по генам. В геномах ахромобактеров по 2 системы DSF, у *B. cepacia* — 1 DSF. В геномах *P. aeruginosa* и *B. gladioli* есть только гены *rpffB*.

Третья система — PQS (pseudomonas quinolone signal), сигнальной молекулой которой является 2-гептил-3-гидроксил-4-хинолон (C₇H₁₆NO₂), в полной комплектации: *pqsABCDHE*, *phnAB* — есть только у *P. aeruginosa*. В геноме *B. cepacia* присутствует *pqsE* — ген белка, отвечающего на хинолоновый сигнал, и *phnAB*, кодирующие белки синтеза антренилата — предшественника PQS [26]. У *Achromobacter* и *B. gladioli* есть только *phnAB*.

Токсины, которые способны продуцировать исследованные изоляты, можно разделить на 4 группы. Первая — токсины T3SS, действующие внутри эукариотической клетки. В геноме *P. aeruginosa* GIMC5045:PA33P25 они представлены 5 генами: *toxA*, *exoS*, *exoT*, *exoY*, *zot*. Ген *toxA* кодирует АДФ-рибозилтрансферазу. Ген *zot* — гомолог холерного токсина, действующего на зонулу окклюденс

(основной из белков плотных контактов эпителия кишечника), у второго изолята *P. aeruginosa* есть 4 гена этой группы. Ген эффектора T3SS нашли и в геномах *Achromobacter* — *axoU*. Во второй группе находятся гены токсинов, повреждающих мембрану клеток эукариот. Гены фосфолипазы С и гемолизина III есть во всех геномах, ген *tlyC* (токсина, формирующего поры) отсутствует у *Achromobacter*, в геноме *B. ceracia* есть еще один ген этой группы — *tlh*, кодирующий термолabileмный гемолизин. В третьей группе неспецифических токсинов только у *P. aeruginosa* присутствуют гены *hcnABC* (синтазы цианистого водорода). Четвертая группа токсинов, повреждающих внеклеточный матрикс, выявлена только у *B. ceracia* и представлена геном *colA* микробной коллагеназы.

Влияние ФТ in vitro

Влияние ФТ на цитотоксичность изолятов, выделенных от пациентов с МВ, начали исследовать с подбора времени контакта бактериальных клеток с клетками HeLa, учитывая медленный рост таких бактерий в культуре. Если при времени контакта 4 ч в дозах 10 и 50 МОИ цитотоксичность изолятов со-

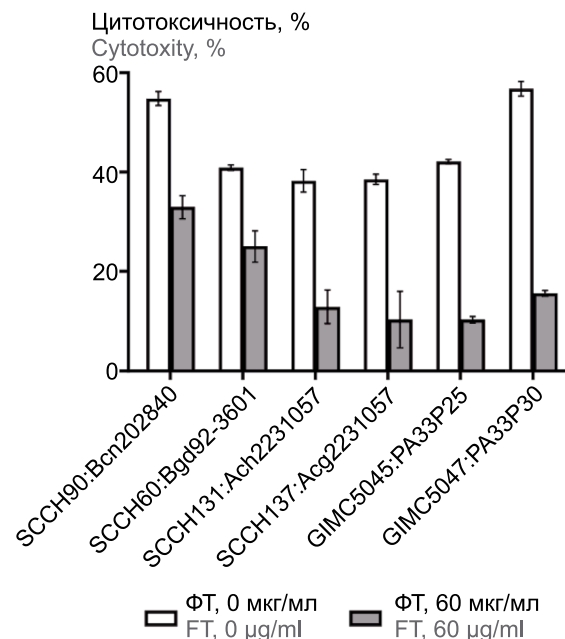


Рис. 1. Влияние ФТ на цитотоксичность бактериальных клеток в отношении клеток HeLa.

Fig. 1. Effect of FT on the cytotoxicity of bacterial cells against HeLa cells.

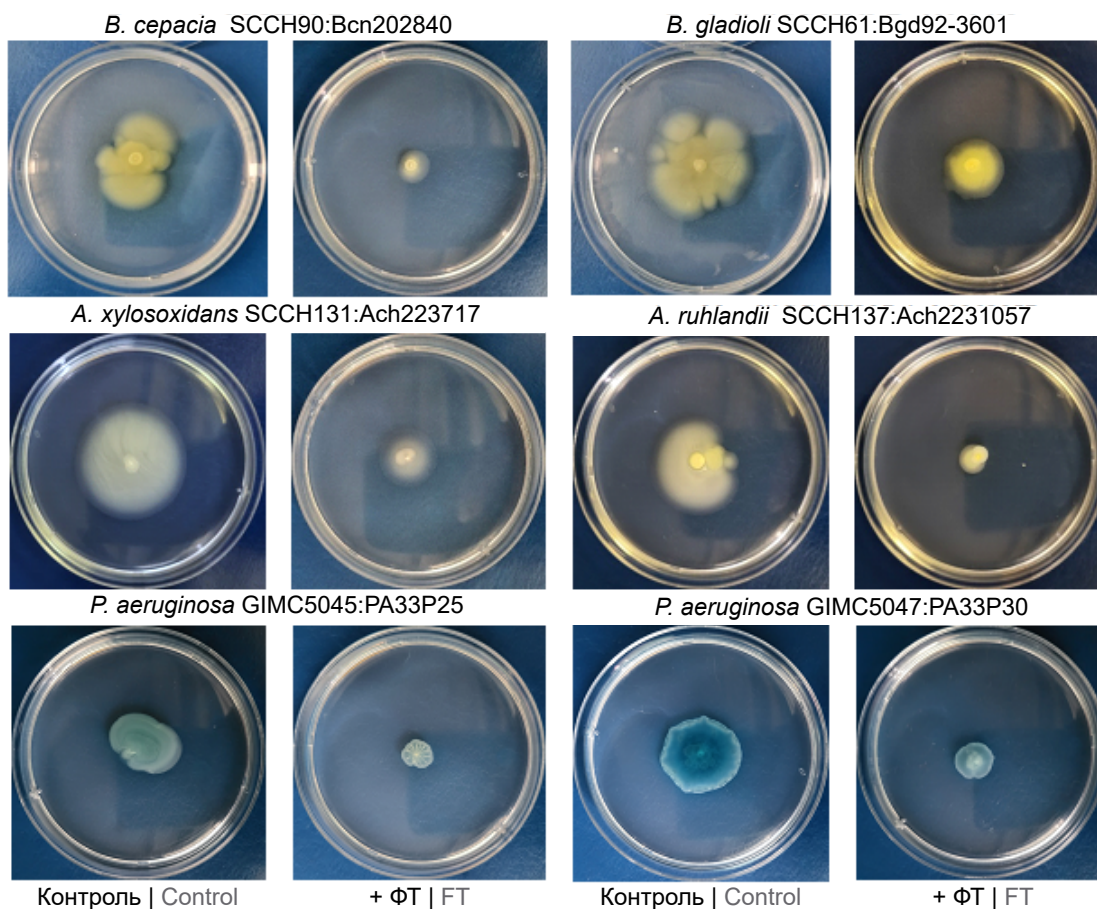


Рис. 2. Влияние ФТ на плавательную подвижность бактериальных клеток.

Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 2. Effect of FT on swimming mobility of bacterial cells. For a color version of the figure, see the journal's website.

ставила 16–26 и 27–43% соответственно, то после 20 ч контакта токсичность поднялась до 70–100%. Оптимальными для изучения влияния ФТ определили дозу 5 МОИ и время контакта 18 ч. Под влиянием ФТ произошло снижение цитотоксичности для всех изолятов: для изолятов *P. aeruginosa* — в 3,6 и 4,0 раза, для *B. cepacia* — в 2,6, для *B. gladioli* — в 3,2, для *A. xylosoxidans* — в 3,0, для *A. ruhlandii* — в 3,7 (рис. 1).

Подвижность изолятов *P. aeruginosa* в контроле была ниже, чем других бактерий (рис. 2). Под влиянием ФТ статистически значимо ($p < 0,05$) сократилась зона перемещения бактерий: для *P. aeruginosa* — в 2,2 и 2,8 раза, для *B. cepacia* — в 2,7, для *B. gladioli* — в 2,0, для *A. xylosoxidans* — в 2,0, для *A. ruhlandii* — в 3,6 (рис. 3).

Процесс формирования биоплёнок различался у изолятов 3 родов. Для *Burkholderia* и *Achromobacter* характерно было достаточно быстрое развитие плотных структур биоплёнки по всей площади лунки, а для *Pseudomonas* образование биоплёнки происходило медленнее и в основном было сосредоточено по краям лунки, где формировалось плотное кольцо (рис. 4). Влияние ФТ сильнее всего

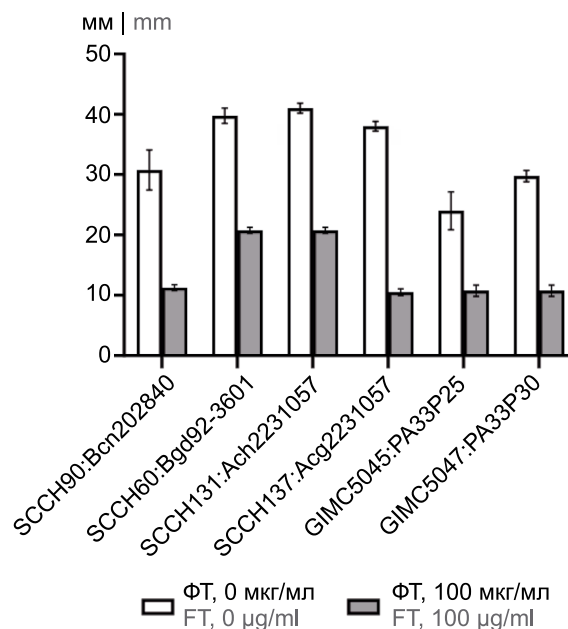


Рис. 3. Изменения диаметра зон плавательной подвижности бактерий.

Fig. 3. Changes in the diameter of bacterial swimming mobility zones.

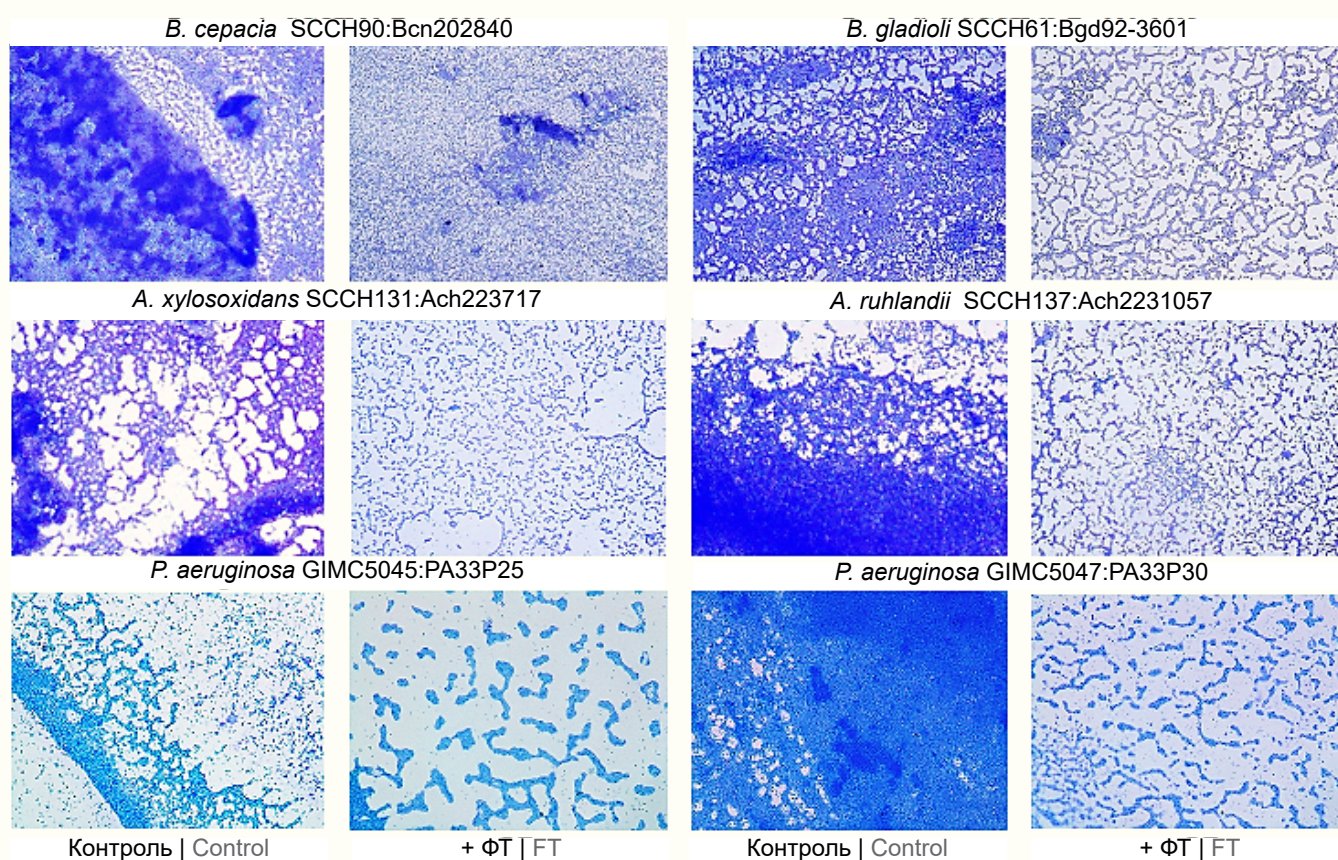


Рис. 4. Влияние ФТ на формирование бактериальных биоплёнок. Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Приведены микрофотографии фрагментов образованной биоплёнки (самые плотные фрагменты).

Fig. 4. Effect of FT on the formation of bacterial biofilms. For a color version of the figure, see the journal's website.

Microphotographs of the formed biofilm fragments (the densest fragments) are shown.

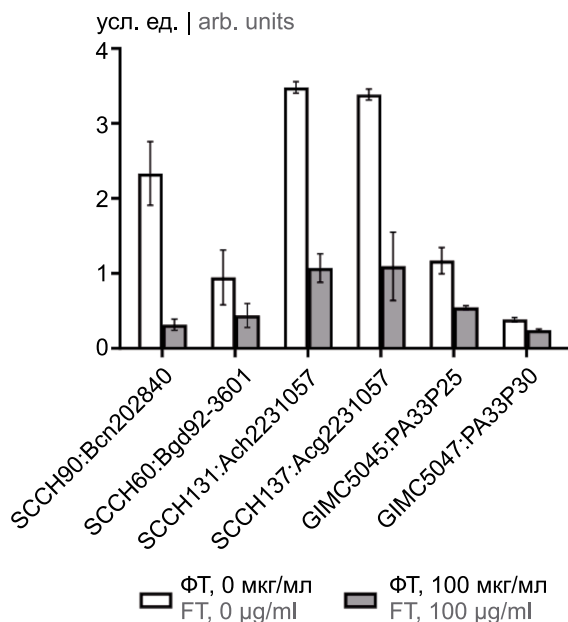


Рис. 5. Оценка накопления биомассы биоплёнок по степени окрашенности кристаллическим фиолетовым по оптической плотности при $\lambda = 540$ нм.

Fig. 5. Evaluation of biofilm biomass accumulation by the degree of crystal violet staining based on optical density ($\lambda = 540$ nm).

было выражено в отношении *B. ceracia*. Биомасса биоплёнки снизилась в 7,7 раза в присутствии антибактериального препарата. Для остальных изолятов снижение биомассы было ниже, но значительно: для *A. xylosoxidans* и *A. ruhlandii* — в 3 раза, для *B. gladioli* — в 2,3, для *P. aeruginosa* — в 2,4 и 2,0 (рис. 5).

Обсуждение

Инфекции респираторного тракта *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. и *Burkholderia* spp. являются самыми частыми и наиболее опасными для пациентов с МВ. Множественная природная резистентность *B. ceracia* complex уже стала постулатом, предупреждение о ней прописано в рекомендациях о тестировании антибиотикочувствительности EUCAST⁸. Антибиотикограмма для *Achromobacter* spp. также является определённым вызовом для лабораторий, поскольку пороговые значения EUCAST даже в рекомендациях 2024 г. даны только для 3 субстанций. Для *P. aeruginosa* проблема заключается в том, что чувствительные *in vitro* изоляты не поддаются эрадикации выбранными препаратами. Проведённые нами геномные исследования показали, что потенциалом, обеспечивающим резистентность *P. aeruginosa* и других исследованных бактерий, мо-

гут быть системы эффлюкса, представленные в геномах в большом количестве. Не следует забывать и о биоплёнках, формирование которых успешно координируют сигналы QS, наличие и разнообразие которых мы подтвердили для всех изученных геномов. Эксперименты *in vitro* показали, что все 6 изолятов формировали плотные биоплёнки. Именно эти структуры помогают бактериям избегать действия антибиотиков в лёгких человека. Однако инновационный препарат ФТ был эффективен в отношении всех проверенных изолятов.

Цитотоксичность представителей трех родов является серьёзной проблемой для тканей лёгких больных МВ. Спектр экзотоксинов, которые могут производить изученные изоляты, достаточно широк. Следует отметить, что в исследовании протеомов *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. и *Burkholderia* spp. нас ждёт ещё много неожиданностей и открытий, поскольку в настоящее время можно аннотировать чуть больше половины тех продуктов трансляции, которые кодируют секвенированные нами геномы. При этом лидером в аннотации является *P. aeruginosa* (57,8%), а последнее место остается за *B. gladioli* — 38,2%. В базах данных ресурсов для аннотирования отсутствуют, например, последовательности генов, кодирующих эффектор T3SS *Achromobacter* spp., поэтому мы провели дополнительный поиск гена *axoU*, обнаружив его в обоих геномах ахромобактеров, названным геном гипотетического белка. Для *B. gladioli* поиск эффекторов T3SS продолжается. S.K. Yadav и соавт. нашли ортолог эффектора T3SS у штамма *B. gladioli* NGJ1, показав наличие сигнала секреции на N-конце полипептида, аннотируемого как белок профага, и продемонстрировали его кальцийзависимую секрецию, опосредованную T3SS [27]. В составе профага рамка такого белка есть и в секвенированном нами геноме. В экспериментах *in vitro* все 6 протестированных изолятов проявили цитотоксичность в отношении клеток HeLa. Цитотоксичность *B. ceracia* была на уровне самого эффективного изолята *P. aeruginosa* при отсутствии T3SS, как показали наши геномные исследования. Следует отметить, что первая публикация, упомянувшая отсутствие T3SS у *B. ceracia*, относится к 2001 г. [28]. Возможно, еще одна наномашина, T6SS, участвует в доставке токсинов *B. ceracia*, тем более что у других бактерий T6SS и T3SS работают в координации [29].

Геномные исследования продемонстрировали арсенал факторов, отвечающих за подвижность исследованных бактерий филума *Pseudomonadota*. Основным из них для плавательной подвижности является флагелла, гены аппарата которой есть во всех 6 геномах. Такой вид подвижности мы наблюдали у протестированных изолятов, в большей степени выраженную у *B. gladioli* и *Achromobacter* в условиях эксперимента.

⁸ Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia ceracia* complex (BCC). 2013. URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/BCC_susceptibility_testing_130719.pdf

Заклучение

Таким образом, геномные исследования и анализ изолятов *in vitro* позволили описать факторы вирулентности 6 бактерий, выделенных от хронически инфицированных пациентов, и продемонстрировать возможность их реализации всеми изолятами для важных в развитии и хронизации инфекции процессов: цитотоксичности, подвижности и формирования биоплёнки.

Инновационный антибактериальный препарат ФТ подавлял три процесса у всех изолятов *in vitro*. Эффективность ФТ в отношении изолятов, выделенных от пациентов с МВ, показана впервые. Проведённые эксперименты послужат заделом для дальнейших доклинических испытаний препарата в отношении новой нозологии, в том числе для опытов на моделях животных. Продолжающиеся всесторонние исследования самого ФТ продемонстрировали накопление препарата, введённого крысам внутрижелудочно, в различных органах животных, в том числе в лёгких [10]. Таким образом, доказательная база действенности ФТ *in vivo* и *in vitro* постоянно расширяется, что вселяет надежду в возможность появления нового помощника в предотвращении и лечении инфекций дыхательных путей у пациентов с МВ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год. СПб.;2023.
2. Kazmierczak B.I., Mostov K., Engel J.N. Interaction of bacterial pathogens with polarized epithelium. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001;55:407–35.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.407>
3. Saldias M.S., Valvano M.A. Interactions of *Burkholderia cenocepacia* and other *Burkholderia cepacia* complex bacteria with epithelial and phagocytic cells. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(Pt. 9):2809–17.
DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.031344-0>
4. Abdillahi S.M., Bober M., Nordin S., et al. Collagen VI is up-regulated in COPD and serves both as an adhesive target and a bactericidal barrier for *Moraxella catarrhalis*. *J. Innate Immun.* 2015;7(5):506–17. DOI: <https://doi.org/10.1159/000381213>
5. Li S.S., Saleh M., Xiang R.F., et al. Natural killer cells kill *Burkholderia cepacia* complex via a contact-dependent and cytolytic mechanism. *Int. Immunol.* 2019;31(6):385–96.
DOI: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz016>
6. Subramani R., Jayaprakashvel M. Chapter 3. Bacterial quorum sensing: biofilm formation, survival behaviour and antibiotic resistance. In: Bramhachari P.V., ed. *Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry*. Singapore;2019:21–37.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-32-9409-7_3
7. Pickrum A.M., DeLeon O., Dirck A., et al. Achromobacter xylooxidans cellular pathology is correlated with activation of a type III secretion system. *Infect. Immun.* 2020;88(7):e00136–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00136-20>
8. Zigangirova N.A., Nesterenko L.N., Sheremet A.B., et al. Fluorothiazinon, a small-molecular inhibitor of T3SS, suppresses salmonella oral infection in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2021;74(4):244–54.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00396-w>
9. Sheremet A.B., Zigangirova N.A., Zayakin E.S., et al. Small molecule inhibitor of type three secretion system belonging to a class 2,4-disubstituted-4H-[1,3,4]-thiadiazine-5-ones improves survival and decreases bacterial loads in an airway *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Biomed. Res. Int.* 2018;2018:5810767.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/5810767>
10. Savitskii M.V., Moskaleva N.E., Brito A., et al. Dose proportional pharmacokinetics, organ distribution, bioavailability and excretion of the antivirulence drug Fluorothiazinon in rats and rabbits. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2024.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-024-00719-1>
11. Zigangirova N.A., Kost E.A., Didenko L.V., et al. A small-molecule compound belonging to a class of 2,4-disubstituted 1,3,4-thiadiazine-5-ones inhibits intracellular growth and persistence of *Chlamydia trachomatis*. *J. Med. Microbiol.* 2016;65(1):91–8. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000189>
12. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С. и др. *Pseudomonas aeruginosa*. Ассистенты и конкуренты в микробиоме инфицированных легких больных муковисцидозом. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(2):186–91. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., et al. *Pseudomonas aeruginosa*. Assistants and competitors in the microbiome of infected of cystic fibrosis patients' lungs. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(2):186–91.
DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15045>
EDN: <https://elibrary.ru/izwatj>
13. Ozer E.A., Nnah E., Didelot X., et al. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of exoU+ and exoS+ lineages. *Genome Biol. Evol.* 2019;11(1):1780–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evz119>
14. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001;Chapter 2:Unit 2.4.
DOI: [10.1002/0471142727.mb0204s56](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56)
15. Brettin T., Davis J.J., Disz T., et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* 2015;5:8365. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08365>
16. Li W., O'Neill K.R., Haft D.H., et al. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D1020–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1105>
17. 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>
18. Chen L., Yang J., Yu J., et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D325–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>
19. Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 2016;428(4):726–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
20. 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>
21. Koroleva E.A., Soloveva A.V., Morgunova E.Y., et al. Fluorothiazinon inhibits the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* involved in the development of urinary tract infection. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2023;76(5):279–90.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00602-5>
22. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2005;Chapter 1: Unit 1B.1.
DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>

23. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С. и др. Основные тенденции в изменении разнообразия буркхолдерий, инфицирующих российских больных муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(2):80–8. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., et al. Major tendencies in burkholderia diversity changes, infecting Russian patients with cystic fibrosis. *Siberian Medical Review*. 2019;(2):80–8. DOI: <https://doi.org/10.20333/2500136-2019-2-80-88> EDN: <https://elibrary.ru/aqpxec>
24. Martínez-Alemán S., Bustamante A.E., Jimenez-Valdes R.J., et al. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients induce neutrophil extracellular traps with different morphologies that could correlate with their disease severity. *Int. J. Med. Microbiol.* 2020;310(7):151451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151451>
25. Wittgens A., Kovack F., Müller M.M., et al. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017;101(7):2865–78. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8041-3>
26. Choi Y., Park H.Y., Park S.J., et al. Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cells*. 2011;32(1):57–65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2322-6>
27. Yadav S.K., Das J., Kumar R., Jha G. Calcium regulates the mycophagous ability of *Burkholderia gladioli* strain NGJ1 in a type III secretion system-dependent manner. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):216. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01897-2>
28. Parsons Y.N., Glendinning K.J., Thornton V., et al. A putative type III secretion gene cluster is widely distributed in the *Burkholderia cepacia* complex but absent from genomovar I. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001;203(1):103–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10827.x>
29. Le Goff M., Vastel M., Lebrun R., et al. Characterization of the *Achromobacter xylosoxidans* type VI secretion system and its implication in cystic fibrosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:859181. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.859181>

Информация об авторах

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

Королева Екатерина Андреевна — к.б.н., с.н.с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9702-2940>

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

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

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

Капотина Лидия Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0159-5053>

Нелюбина Станислава Андреевна — м.н.с. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5157-1415>

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

Зигангирова Наиля Ахатовна — д.б.н., профессор, г.н.с., зав. лаб. хламидиозов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3188-1608>

Вклад авторов: Воронина О.Л. — методология и дизайн геномного исследования, биоинформационный анализ, написание и редактирование рукописи; Королева Е.А. — исследования *in vitro*, анализ результатов, визуализация, написание рукописи; Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И. — геномные исследования, биоинформационный и статистический анализ, визуализация, написание рукописи; Капотина Л.Н. — исследования *in vitro*; Нелюбина С.А. — методика исследования биоплёнок *in vitro*; Лазарева А.В. — выделение культур микроорганизмов; Зигангирова Н.А. — методология и дизайн исследования *in vitro*, редактирование рукописи. 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 09.02.2024;
принята к публикации 23.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

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

Ekaterina A. Koroleva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of chlamydiosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9702-2940>

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

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

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

Lidia N. Kapotina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of chlamydiosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0159-5053>

Stanislava A. Nelubina — junior researcher, Laboratory of chlamydiosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5157-1415>

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

Nailya A. Zigangirova — D. Sci. (Biol.), Professor, chief researcher, Head, Laboratory of chlamydiosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3188-1608>

Author contribution: Voronina O.L. — methodology and design of genomic research, bioinformation analysis, writing and editing of the manuscript; Koroleva E.A. — *in vitro* studies, analysis of results, visualization, writing the manuscript; Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I. — genomic research, bioinformational and statistical analysis, visualization, manuscript writing; Kapotina L.N. — *in vitro* studies; Nelubina S.A. — methodology for studying biofilms *in vitro*; Lazareva A.V. — isolation of microorganism cultures; Zigangirova N.A. — methodology and design of the *in vitro* study, editing the manuscript.

The article was submitted 09.02.2024;
accepted for publication 23.03.2024;
published 29.04.2024

Оригинальная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-398>

Исследование устойчивости вируса иммунодефицита человека типа I к антиретровирусным препаратам у наивных пациентов в Армении в 2017–2021 годах

Осадчая О.А.^{1✉}, Киреев Д.Е.¹, Салеева Д.В.¹, Кириченко А.А.¹, Лаповок И.А.¹, Лопатухин А.Э.¹, Шлыкова А.В.¹, Махмудова Л.Ф.¹, Ладная Н.Н.¹, Овакимян Э.М.², Мартоян С.В.², Казарян О.К.², Овсепян Т.В.², Саргсянц Н.К.², Покровский В.В.¹

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

²Национальный центр инфекционных болезней, Ереван, Республика Армения

Аннотация

Введение. Увеличение охвата пациентов, принимающих антиретровирусную терапию (АРВТ), и ограничения в проведении тестов на лекарственную устойчивость (ЛУ) определяют важность эпидемиологического надзора за резистентностью ВИЧ-1 в Республике Армения.

Цель исследования — определение распространённости ЛУ ВИЧ-1 на обширной выборке ВИЧ-инфицированных граждан Республики Армения, не имевших опыта приёма антиретровирусных препаратов (АРВП).

Материалы и методы. Исследование было выполнено на выборке, составляющей более 20% людей, живущих с ВИЧ, в Республике Армения. Полученные 982 нуклеотидные последовательности фрагмента гена *pol* ВИЧ-1, кодирующих область протеазы и обратной транскриптазы, а также 367 последовательностей гена интегразы были проанализированы с помощью базы данных Стенфордского университета и инструмента CPR на наличие мутаций резистентности и определение уровня ЛУ к АРВП. Субтип ВИЧ-1 в исследованных образцах был определён с помощью базы данных Стэнфордского университета и подтверждён филогенетическим анализом.

Результаты. Общая распространённость ЛУ к АРВП у наивных пациентов составила 13,8%. Резистентность к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы составила 11,2%, к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы — 1,4%, к ингибиторам протеазы — 2,0%, к ингибиторам интегразы — 0,5%. Преобладающим генетическим вариантом среди вирусов, содержащих мутации резистентности, был субтип В. Резистентность наиболее часто регистрировалась у мужчин, имеющих секс с мужчинами, проживающих в Ереване.

Заключение. В нашем исследовании высокий уровень ЛУ оказался высоким только к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. Результаты показывают, что рекомендуемые в современных национальных руководствах АРВП 1-й линии терапии с высокой долей вероятности будут эффективными. Проведённый анализ был осуществлён на значимой доле ВИЧ-инфицированных граждан Республики Армения, что повышает достоверность и точность полученных данных.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, лекарственная устойчивость, антиретровирусная терапия, мутации резистентности, Республика Армения

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 92 от 21.05.2019).

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: Осадчая О.А., Киреев Д.Е., Салеева Д.В., Кириченко А.А., Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Шлыкова А.В., Махмудова Л.Ф., Ладная Н.Н., Овакимян Э.М., Мартоян С.В., Казарян О.К., Овсепян Т.В., Саргсянц Н.К., Покровский В.В. Исследование устойчивости вируса иммунодефицита человека типа I к антиретровирусным препаратам у наивных пациентов в Армении в 2017–2021 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):184–192.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-398>

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

HIV-1 drug resistance among naïve patients in Armenia in 2017–2021

Olga A. Osadchaya¹✉, Dmitry E. Kireev¹, Daria V. Saleeva¹, Alina A. Kirichenko¹, Ilya A. Lapovok¹, Alexey E. Lopatukhin¹, Anastasia V. Shlykova¹, Leila F. Makhmudova¹, Natalia N. Ladnaya¹, Ermis M. Hovakimyan², Siranush V. Martoyan², Hovsep K. Kazaryan², Tamara V. Hovsepyan², Narina K. Sargsyants², Vadim V. Pokrovsky¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²National Center for Infectious Diseases, Yerevan, Republic of Armenia

Abstract

Background. The increased antiretroviral therapy (ART) coverage of patients in the absence of routine drug resistance (DR) tests highlight the importance of HIV-1 drug resistance surveillance in Armenia.

Aim. The aim of this study was a determination of the prevalence of HIV-1 DR on a large-scale cohort of HIV-infected citizens of the Republic of Armenia who had no experience of taking antiretroviral drugs.

Materials and methods. The study was carried out on a cohort of more than 20% of PLHIV in the Republic of Armenia. The resulting 982 nucleotide sequences of the HIV-1 pol gene fragment, encoding the protease and reverse transcriptase region, as well as 367 sequences of the integrase gene, were analyzed using the Stanford University database and the CPR tool for the presence of drug resistance mutations and determination of the resistance level to ARV drugs. The HIV-1 subtype was determined using the Stanford University database and confirmed by phylogenetic analysis.

Results. The overall prevalence of HIV DR to ARV drugs in naïve patients was 13.8%. Resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors was 11.2%, nucleotide reverse transcriptase inhibitors — 1.4%, protease inhibitors — 2.0% and integrase inhibitors — 0.5%. The predominant genetic variant among viruses containing DR mutations was subtype B. Resistance was most often recorded among men who have sex with men living in Yerevan.

Conclusion. In our study, prevalence of DR was high only for the NNRTI drugs. The results show that the first-line ARV drugs recommended in current national guidelines are highly likely to be effective. The analysis was carried out on a significant proportion of HIV-infected citizens of the Republic of Armenia, which increases the reliability and accuracy of the data obtained.

Keywords: HIV infection, drug resistance, antiretroviral therapy, mutation, Armenia

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol No. 92, May 21, 2019).

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: Osadchaya O.A., Kireev D.E., Saleeva D.V., Kirichenko A.A., Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Shlykova A.V., Makhmudova L.F., Ladnaya N.N., Hovakimyan E.M., Martoyan S.V., Kazaryan H.K., Hovsepyan T.V., Sargsyants N.K., Pokrovsky V.V. HIV-1 drug resistance among naïve patients in Armenia in 2017–2021. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):184–192.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-398>

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

Введение

Республика Армения — страна Восточной Европы и Центральной Азии (ВЕЦА), активно участвующая в борьбе с ВИЧ/СПИДом на протяжении последних десятилетий. По данным глобальной статистики Организации Объединенных Наций по борьбе с ВИЧ/СПИД (ЮНЭЙДС)¹, в странах ВЕЦА

на 2021 г. насчитывалось 1,8 млн людей, живущих с ВИЧ, и число новых случаев инфицирования продолжает увеличиваться.

После распада Советского Союза период экономического коллапса серьезно ослабил инфраструктуру здравоохранения новых независимых республик. В тот период эпидемии ВИЧ-1 уделялось мало внимания. В значительной части бывшего Советского Союза наблюдалась одна из самых быстрорастущих эпидемий ВИЧ-1 в мире, в некоторых регионах количество инфицированных лиц ежегодно

¹ ЮНЭЙДС. Информационный бюллетень — последние глобальные и статистические данные о состоянии эпидемии СПИДа 2022 г.

URL: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet>

но удваивалось [1]. Политика открытых границ в регионах не препятствовала миграции, которая в свою очередь способствовала распространению инфекционных заболеваний². Результаты исследований показывают, что среди граждан Армении самая высокая распространённость ВИЧ-1 была зафиксирована среди трудовых мигрантов [2, 3].

Одной из основных причин роста случаев инфицирования ВИЧ-1 в Армении являлся низкий уровень доступа к антиретровирусной терапии (АРВТ). Комбинированная АРВТ стала широко распространяться в мире с 1996 г. Однако в странах с низким и средним уровнем дохода внедрение АРВТ произошло только в середине 2000-х гг. [4]. Благодаря усилиям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в начале XX в. снизилось неравенство между богатыми и бедными странами в отношении возможности лечения. Развивающиеся страны получили возможность приобретать препараты по доступным ценам, что в свою очередь снизило смертность. В этот период было издано первое руководство по лечению ВИЧ-1 в условиях ограниченных ресурсов, которое содержало упрощённые схемы лечения [5].

В настоящее время поражённость населения в Армении ВИЧ-инфекцией невысока. Общее число случаев заражения не превышает 4600 человек, что составляет всего 0,12% населения страны³. Как и в других странах, программы в Армении нацелены на достижение целей ЮНЭЙДС. По итогам стратегии «90–90–90» в регионе был достигнут хороший результат — в 2020 г. 81% людей, живущих с ВИЧ, знали свой статус, и 86% людей, кому была назначена АРВТ, достигли неопределяемой вирусной нагрузки⁴. С 2018 г. предпочтительная схема лечения включает ингибитор интегразы (ИИ) долутегравир в комбинации с двумя нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (НИОТ) — тенофовиром, ламивудином или эмтрицитабином. Альтернативная схема представляет собой два препарата НИОТ (тенофовир и ламивудин) и один препарат группы нунуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) — эфавиренз⁵.

В связи с увеличением количества пациентов, принимающих АРВТ, значимой проблемой в борьбе

с эпидемией ВИЧ-инфекции является развитие резистентности вируса. ВОЗ рекомендует проводить тестирование на устойчивость к препаратам до лечения и при неэффективности АРВТ. К сожалению, такой подход доступен не всем странам. В большинстве развивающихся стран тестированию подвергаются только определённые группы пациентов и только в случае вирусологического неуспеха АРВТ⁶.

Тесты на резистентность ВИЧ также рекомендуется проводить с целью эпидемиологического надзора за лекарственной устойчивостью (ЛУ) [6]. Согласно отчётам ВОЗ, распространённость передаваемой ЛУ за 2017 и 2020 гг. в большинстве стран превысила порог 5%, причём у 67% стран этот показатель превысил 10%. Наличие ЛУ ВИЧ-1 у наивных пациентов уменьшает выбор эффективной АРВТ и может увеличить риск вирусологической неудачи лечения [7].

В ранее опубликованных работах исследовалась распространённость ЛУ ВИЧ-1 в Армении у нелеченных пациентов и сообщалось о значительном росте резистентности. Если в 2015 г. уровень устойчивости составлял всего 1,5%, то в исследованиях 2020 и 2021 гг. распространённость ЛУ увеличилась до 5,5 и 9,2% соответственно и приблизилась к 10% порогу ВОЗ, по достижении которого необходимо пересматривать клинические рекомендации по лечению [8–10]. Однако в публикации 2022 г. указывалось на снижение в 2020–2021 гг. уровня ЛУ у наивных пациентов до 7,5% [11]. Проведённые ранее исследования ЛУ ВИЧ-1 характеризовались небольшими размерами выборок, в связи с чем имели ограниченную достоверность результатов.

Цель исследования — оценка распространённости и структуры ЛУ ВИЧ-1 в Республике Армения путём анализа обширной когорты пациентов, не имевших опыта приёма антиретровирусных препаратов (АРВП).

Материалы и методы

Сбор биологического материала и сопутствующей информации о пациентах проходил в 2018–2022 гг. Всего в исследовании приняло участие 982 пациента, ранее не получавших АРВТ. Пациенты включались последовательно во время визитов в Республиканский центр по профилактике СПИДа Министерства здравоохранения Республики Армения. Собираемые демографические и клинические данные содержали возраст, пол, дату первого положительного иммунного блота, предполагаемый путь передачи ВИЧ-1, вирусную нагрузку РНК ВИЧ-1 и количество CD4⁺-клеток. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии па-

² ЮНЭЙДС. Информационный бюллетень — глобальная статистика по ВИЧ и СПИДУ 2019 г.
URL: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet>

³ Joint United Nations Programme on HIV/AIDS 2021.
URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC3032_AIDS_Data_book_2021_En.pdf

⁴ UNAIDS DATA, 2021. URL: https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021_unaids_data

⁵ Мониторинг закупок препаратов для лечения ВИЧ-инфекции и ВГС; выработка решений по оптимизации ситуации с целью способствования бесперебойному доступу к препаратам в Республике Армения, 2020.

URL: https://itpc-ecca.org/wp-content/uploads/2020/11/armenia_monitoring_final_05.11.2020.pdf

⁶ World Health Organization. Global action plan on HIV drug resistance 2017–2021: 2018 progress report, July 2018: executive summary. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/273049>

циентов. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 92 от 21.05.2019).

Образцы исследовали методом массового параллельного секвенирования с помощью лабораторной методики, разработанной в ЦНИИ Эпидемиологии ($n = 367$), либо классического секвенирования по Сэнгеру с использованием набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ЦНИИ Эпидемиологии) ($n = 615$). При массовом параллельном секвенировании анализу подвергались три вирусных гена: протеаза, обратная транскриптаза и интегразы. При проведении секвенирования по Сэнгеру были получены нуклеотидные последовательности гена протеазы и фрагмента гена обратной транскриптазы, в которых могут появляться мутации резистентности. Секвенирование осуществляли с помощью приборов «MiSeq» («Illumina») и «Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer» («Life Technologies»).

Предварительное субтипирование ВИЧ-1 было выполнено с использованием онлайн-инструментов «REGA v. 3.0»⁷ и базы данных Стенфордского университета⁸. Результаты предварительного субтипирования были проверены методом филогенетического анализа с помощью программного обеспечения «MEGA v. 6.0» с референтными последовательностями субтипов ВИЧ-1 и рекомбинантных форм, загруженных из базы данных «Los-Alamos»⁹. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и дальнейшее редактирование проводили с помощью «BioEdit v. 7.2»¹⁰.

Качество нуклеотидных последовательностей оценивали с использованием инструментов «WHO HIV DR v. 2.30»¹¹ и «Calibrated Population Resistance Tool»¹².

ЛУ к АРВП идентифицировали с использованием базы данных Стенфордского университета. Мутации резистентности из перечня надзорных мутаций были определены с помощью списка ВОЗ «Surveillance Drug Resistance Mutation Worksheet» (2014 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика исследуемой группы

Средний возраст участников на момент включения в исследование составил 41 (19–75) год, наи-

большее количество людей с ВИЧ-инфекцией было в возрасте 30–40 лет; 68,9% пациентов были мужского пола. В исследуемой группе в качестве наиболее вероятного пути передачи инфекции преобладал гетеросексуальный (83,2%).

Результаты субтипирования показали высокую степень генетического разнообразия среди вариантов, циркулирующих в исследуемом регионе. Преобладающим являлся ВИЧ-1 суб-субтипа А6 с долей 87,0%, следующим по частоте встречаемости был субтип В (5,9%). В единичных случаях выявлялись также вирусы субтипов А1, С и G. Кроме того, были обнаружены 6 различных рекомбинантных форм: CRF02_AG, CRF03_A6B, CRF06_crx, CRF20_BG, CRF24_BG и CRF63_02A6, которые часто встречаются в странах ВЕЦА.

Эпидемиологические данные участников исследования представлены в **табл. 1**. Для каждой эпидемиологической группы был посчитан 95% доверительный интервал (ДИ).

Оценка распространённости ЛУ к АРВП и мутаций резистентности

Проведён анализ 982 нуклеотидных последовательностей для определения ЛУ ВИЧ-1 к АРВП классов НИОТ, ННИОТ и ингибиторов протеазы (ИП) и 367 нуклеотидных последовательностей для определения ЛУ ВИЧ-1 к препаратам класса ИИ.

Общая распространённость ЛУ ВИЧ к препаратам всех классов составила 13,8% (95% ДИ 11,8–16,2%). К отдельным классам АРВП ЛУ встречалась с частотой: к ИП — 2,0% (95% ДИ 1,3–3,1%); к НИОТ — 1,4% (95% ДИ 0,8–2,4%); к ННИОТ — 11,2% (95% ДИ 9,4–13,3%); к ИИ — 0,5% (95% ДИ 0,02–2,1%). Подробная информация о распространённости ЛУ к каждому препарату в отдельности представлена на **рис. 1**.

ЛУ ВИЧ наиболее часто регистрировалась к препарату рилпивирин класса ННИОТ (9,7% случаев), правда, в 7,6% случаев это была резистентность низкого уровня. К другим препаратам этого класса — невирапину и эфавирензу — ЛУ была выявлена в 4,2 и 3,5% случаях соответственно, причём в основном это была резистентность высокого уровня. Резистентность к каждому в отдельности АРВП классов НИОТ, ИП и ИИ не превышала 2%.

Надзорные мутации резистентности, выявленные более чем у 1 пациента, представлены в **табл. 2**.

К АРВП класса ИИ надзорные мутации ЛУ были выявлены только в 2 случаях — у 1 пациента — *E92G* и у второго — *Y143H*.

Общая распространённость надзорных мутаций ЛУ ВИЧ-1 к АРВП класса ИП составила 1,4% (95% ДИ 0,8–2,4%), класса НИОТ — 1,5% (95% ДИ 0,9–2,5%), класса ННИОТ — 3,1% (95% ДИ 2,1–4,3%), класса ИИ — 0,6% (95% ДИ 0,02–2,10%).

⁷ Stanford University. REGA HIV-1 Subtyping Tool — Version 3.0. URL: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>

⁸ Stanford University. HIV Drug Resistance Database. URL: <https://hivdb.stanford.edu/>

⁹ HIV databases. URL: <https://www.hiv.lanl.gov/content/index>

¹⁰ BioEdit 7.7. URL: <https://bioedit.software.informer.com>

¹¹ WHO HIVDR QC Tool.

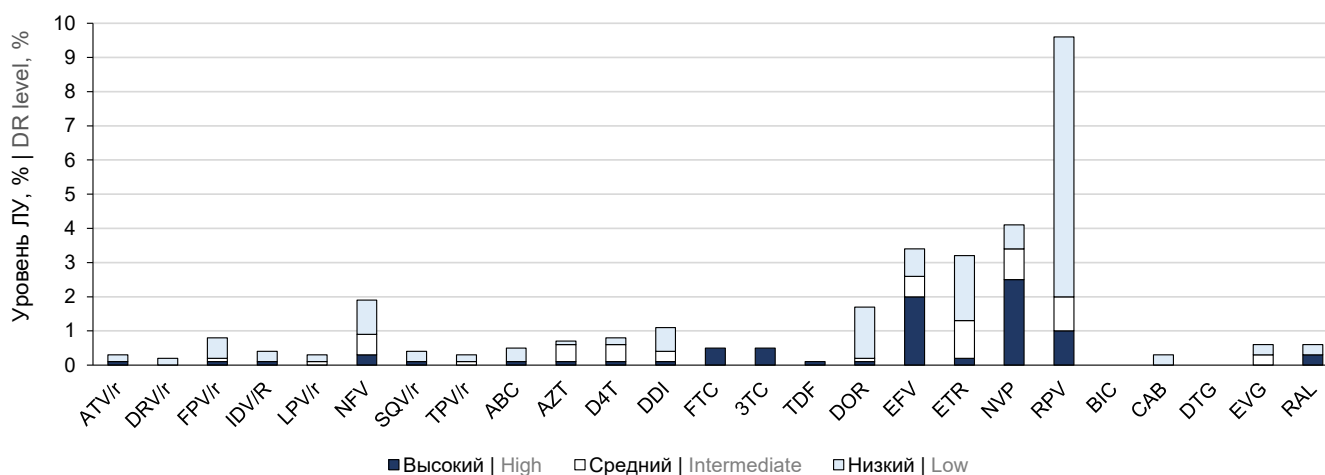
URL: https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc

¹² Calibrated Population Resistance Tool.

URL: <https://hivdb.stanford.edu/cpr>

Таблица 1. Эпидемиологические характеристики пациентов, включённых в исследование, *n* (%; 95% ДИ)**Table 1.** Epidemiological characteristics of patients included in the study, *n* (%; 95% CI)

Характеристики Characteristics	Мужчины Men	Женщины Women	Всего All
Количество пациентов Number of patients	677 (68,9; 66,0–71,8)	305 (31,1; 28,2–34,0)	982
Группа риска передачи инфекции Transmission risk group of infection			
Гетеросексуальный контакт Heterosexual	514 (52,3; 49,2–55,5)	303 (30,9; 28,0–33,8)	817 (83,2; 80,7–85,4)
Мужчины, имеющие половые контакты с мужчинами Men who have sex with men	98 (10,0; 8,3–12,0)	–	98 (10,0; 8,3–12,0)
Потребители инъекционных наркотиков Injecting drug users	65 (6,6; 5,2–8,4)	2 (0,2; < 0,01–0,8)	67 (6,8; 5,4–8,6)
Генетические варианты ВИЧ-1 HIV-1 genetic variants			
A1	1 (0,1; < 0,01–0,6)	0	1 (0,1; < 0,01–0,6)
A6	567 (57,7; 54,6–60,8)	287 (29,2; 26,5–32,2)	854 (87,0; 84,7–88,9)
B	56 (5,7; 4,4–7,3)	2 (0,2; < 0,01–0,8)	58 (5,9; 4,6–7,6)
C	1 (0,1; < 0,01–0,6)	1 (0,1; < 0,01–0,6)	2 (0,2; < 0,01–0,8)
G	1 (0,1; < 0,01–0,6)	0	1 (0,1; < 0,01–0,6)
CRF02_AG	16 (1,6; 1,0–2,7)	6 (0,6; 0,3–1,4)	22 (2,2; 1,5–3,4)
CRF03_A6B	5 (0,5; 0,2–1,2)	2 (0,2; < 0,01–0,8)	7 (0,7; 0,3–1,5)
CRF06_crx	2 (0,2; < 0,01–0,8)	1 (0,1; < 0,01–0,6)	3 (0,3; 0,1–0,9)
CRF20_BG	1 (0,1; < 0,01–0,6)	0	1 (0,1; < 0,01–0,6)
CRF24_BG	7 (0,7; 0,3–1,5)	0	7 (0,7; 0,3–1,5)
CRF63_02A6	20 (2,0; 1,3–3,1)	6 (0,6; 0,3–1,4)	26 (2,7; 1,8–3,9)

**Рис. 1.** Частота возникновения и уровень резистентности к АРВП.**Fig. 1.** Frequency of occurrence and level of resistance to antiretroviral drugs.

Зависимость распространённости резистентности от анализируемых показателей исследуемой выборки

В работе была изучена динамика распространённости ЛУ к АРВП различных классов в зависимости от года первого положительного иммунного блота. Для получения сопоставимых по размеру когорт были сформированы группы пациентов с выявленной ВИЧ-инфекцией: до 2017 г. включительно ($n = 146$), в 2018 г. ($n = 241$), 2019 г. ($n = 332$), 2020 г. ($n = 81$) и 2020 г. ($n = 182$). Результаты анализа пред-

ставлены на **рис. 2**. Динамика общей распространённости ЛУ ВИЧ-1 к АРВП в значительной степени была обусловлена ЛУ к АРВП класса ННИОТ. За исследуемый период отмечена незначительная тенденция к росту ЛУ в стране. С 2020 г. значительная часть больных стала получать в схеме терапии 1-го ряда АРВП из группы ИИ — долутеграбир, и этот показатель к концу 2021 г. возрос с 30 до 80% [8, 11]. Вероятно, с этим связано появление единичных случаев резистентности вируса к АРВП этого класса в 2019–2020 гг.

Таблица 2. Надзорные мутации ЛУ ВИЧ-1, выявленные более чем у 1 пациента

Table 2. Surveillance HIV-1 drug resistance mutations HIV-1 identified more than in one patient

Надзорные мутации ЛУ Surveillance DR mutations	Количество пациентов Patients count	Распространённость мутаций, % (95% ДИ) Prevalence mutations, % (95% CI)
Мутации ННИОТ Mutations NNRTI		
<i>K101E</i>	13	1,3 (0,8–2,3)
<i>K103N</i>	12	1,2 (0,7–2,2)
<i>Y181C</i>	7	0,7 (0,3–1,5)
<i>G190A</i>	8	0,8 (0,4–1,6)
Мутации НИОТ Mutations NRTI		
<i>T69D</i>	3	0,3 (0,06–0,9)
<i>M184V</i>	4	0,4 (0,1–1,1)
<i>L210W</i>	5	0,5 (0,2–1,2)
<i>T215D</i>	4	0,4 (0,1–1,1)
Мутации ИП Mutations PI		
<i>D30N</i>	2	0,2 (< 0,001–0,8)
<i>M46I</i>	6	0,6 (0,2–1,4)

Нами проанализирована ассоциация между распространённостью ЛУ ВИЧ-1 к АРВП и генетическими вариантами вируса. Среди вариантов, встречающихся более чем в 1% случаев, наиболее

часто резистентными являлись вирусы субтипа В — в 36,2% случаев (21 из 58). Выше среднего уровня они также регистрировались у пациентов, инфицированных CRF63_02A6, — у 15,4% (4 из 26). Ниже среднего они встречались у пациентов с суб-субтипом А6 — у 11,5% (98 из 854) и CRF02_AG — у 9,1% (3 из 22).

Распространённость ЛУ ВИЧ-1 к АРВП у мужчин регистрировалась почти в 1,5 раза чаще, чем у женщин, — 15,4% по сравнению с 10,5% ($p = 0,041$). Анализ распространённости резистентности в зависимости от предполагаемой группы риска показал, что наиболее часто резистентные варианты встречались среди мужчин, имеющих секс с мужчинами (27,6%; 27 из 98), затем среди потребителей инъекционных наркотиков (17,9%; 12 из 67). Реже всего ЛУ-вирусы обнаруживались среди пациентов, инфицированных в ходе гетеросексуального контакта (11,9%; 97 из 817).

На заключительном этапе была проанализирована распространённость ЛУ ВИЧ-1 к АРВП в различных регионах Армении. Все они были поделены на три группы: г. Ереван; области, прилегающие к Еревану; области, удалённые от Еревана.

В ряде областей, таких как Сюникская и Тавушская, распространённость ЛУ ВИЧ-1 была наивысшей (табл. 3). Однако в среднем частота встречаемости в близлежащих и удалённых областях

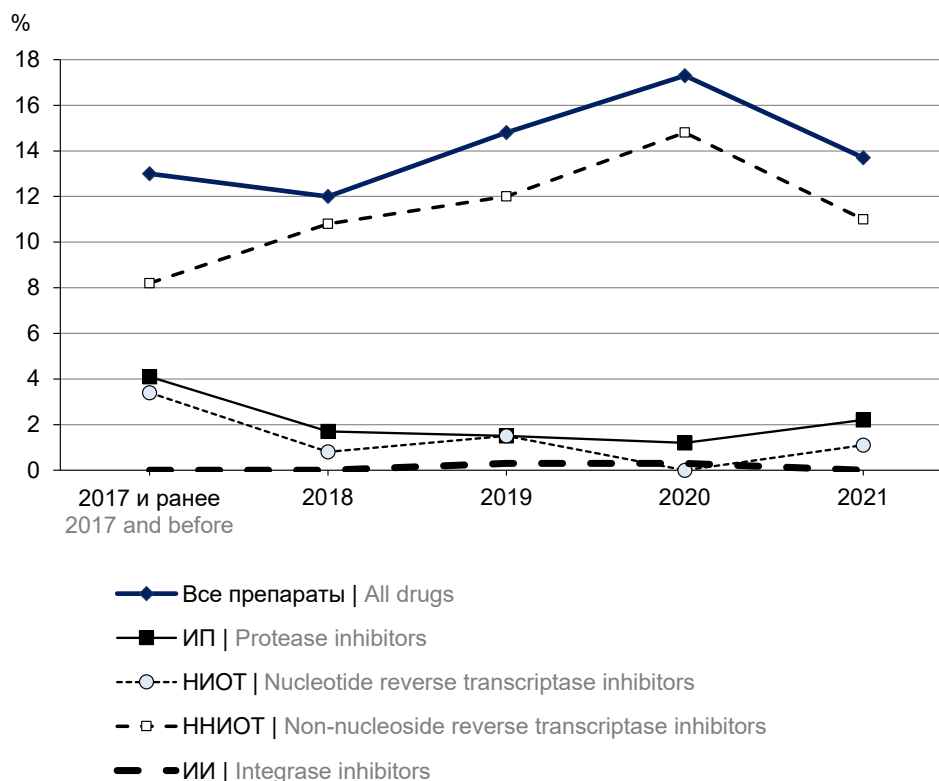


Рис. 2. Динамика распространённости ЛУ ВИЧ-1 к АРВП в зависимости от года первого положительного иммунного блота.

Fig. 2. The dynamics of HIV-1 drug resistance by the year of the first positive immune blot.

Таблица 3. Распространённость ЛУ ВИЧ-1 в регионах Армении**Table 3.** Prevalence of HIV-1 DR in the regions of Armenia

Регион Region	Количество пациентов Patients count	Количество пациентов с ЛУ Patients with drug resistance count	Распространённость, % Prevalence, %
Ереван Yerevan	278	47	16,9
Близлежащие области Nearby regions			
Арагацотнская Aragatsonion	34	4	11,8
Армавирская Armavir	79	12	15,2
Арагатская Ararat	94	11	11,7
Котайская Kotay	77	9	11,7
Удалённые области Remote regions			
Вайодзорская Vayodzor	18	1	5,6
Гехаркуникская Gegharkunik	96	10	10,4
Лорийская Lori	91	11	12,1
Сюникская Syunik	68	12	17,6
Тавушская Tavush	30	6	20,0
Ширакская Shirak	117	13	11,1

была ниже, чем в столице, — 12,7 и 12,6% соответственно.

Обсуждение

Выполненная работа представляет собой национальное эпидемиологическое исследование ЛУ ВИЧ-1 в Республике Армения с использованием обширной выборки наивных пациентов. Общая распространённость ЛУ к АРВП составила 13,8% и была несколько выше, чем описано в других исследованиях. Коллективы, ранее проводившие изучение резистентности ВИЧ у пациентов без опыта приёма АРВТ, показали распространённость 5,5–9,2% [9–11]. Однако необходимо учитывать, что в указанных исследованиях ЛУ оценивалась не ко всем АРВП. В частности, в соответствии с предыдущими исследованиями, устойчивость к АРВП группы ННИОТ варьировала от 4,4 до 6,0%, в нашем исследовании этот показатель повысился до 11,2% [9, 11]. Такое значимое различие было получено в связи с тем, что в нашем исследовании учитывалась ЛУ ВИЧ-1 к рилпивирину. Если же провести сравнение по отдельным препаратам, то в предыдущем исследовании [11] ЛУ к EFV и NVP составила 6 и 6,8%, а в текущем — 3,5 и 4,2% соответственно.

АРВП группы ННИОТ обладают низким генетическим барьером, и единичная точечная замена в обратной транскриптазе может приводить к развитию устойчивости высокого уровня и в дальнейшем к передаче устойчивых вариантов с изменениями в популяцию. Поэтому среди пациентов в данном классе продолжали сохраняться мутации, значительно снижающие чувствительность к невирапину и эфавирензу. Поскольку в регионе тесты на первичную резистентность в рутинном порядке не проводятся, и в связи с руководством ВОЗ от 2018 г.,

в схеме терапии 1-го ряда начали использовать комбинацию 2 НИОТ + 1 ИИ. Невирапин был исключён из перечня препаратов для лечения ВИЧ-1 в Армении, а эфавиренз рекомендовали для назначения в составе альтернативной схемы.

В то же время по отношению к классам НИОТ, ИП и ИИ была зафиксирована низкая распространённость ЛУ. Уровень ЛУ к НИОТ значительно снизился — с 5,0 до 1,4% [10, 11]. Наиболее часто у пациентов обнаруживались замены, обуславливающие ЛУ высокого уровня к ламивудину и эмтрицитабину.

В нашем исследовании впервые в Республике Армения была оценена эффективность применения ИИ у лиц, ранее не получавших АРВТ, и выявлены мутации резистентности, значительно снижающие чувствительность к ралтегравиру и частично к элвитегравиру.

Результаты показали, что комбинации препаратов, используемые в 1-й линии терапии, являются эффективными, и это подтверждают данные об увеличении неопределяемой вирусной нагрузки у лиц, получающих АРВТ, с 68% в 2016 г. до 86% в 2020 г.¹³ Однако нужно с осторожностью назначать

¹³ European Centre for Disease Prevention and Control Continuum of HIV care. Monitoring Implementation of the Dublin Declaration on Partnership to Fight HIV/AIDS in Europe and Central Asia: 2018 Progress Report. Stockholm: ECDC. 2018. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/continuum-hiv-care-monitoring-implementation-dublin-declaration-2018-progress> (дата обращения: 05.08.2022); European Centre for Disease Prevention and Control Continuum of HIV Care. Monitoring Implementation of the Dublin Declaration on Partnership to Fight HIV/AIDS in Europe and Central Asia: 2020 Progress Report. Stockholm: ECDC. 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hiv-continuum-care-monitoring-implementation-dublin-declaration> (дата обращения: 05.08.2022).

или минимизировать схемы терапии, содержащие эфавиренз и невирапин, поскольку доля циркулирующих ЛУ-вариантов вируса к каждому из препаратов достаточно высока и составляет приблизительно 4%¹⁴.

Общая распространённость мутаций, важных с точки зрения надзора, не превышала 5% ни для одного из классов АРВП в отдельности и была наивысшей для класса ННИОТ (3,1%).

В нашем исследовании были проанализированы ассоциации между наличием ЛУ и различными характеристиками вируса и пациента. Обнаружено, что вероятность резистентности была намного выше в случае инфекции, вызванной вирусом субтипа В. ЛУ-варианты чаще регистрировались у пациентов мужского пола; из группы риска мужчин, имеющих половые контакты с мужчинами; проживающих в г. Ереване.

Распространённость вариантов ВИЧ-1 с резистентностью высокого уровня повышает риск передачи первичной ЛУ. Поэтому оценка показателей широты распространения передаваемой ЛУ является объективной необходимостью не только для успешного назначения терапии, но и для минимизации риска передачи ЛУ-вариантов вируса.

Заключение

В нашем исследовании уровень ЛУ ВИЧ-1 к АРВП у пациентов без опыта приёма терапии составил 13,8%. Однако в основном он был обусловлен резистентностью к АРВП класса ННИОТ. Данные результаты показывают, что рекомендуемые в настоящее время АРВП классов НИОТ, ИП, ИИ с высокой долей вероятности будут эффективными, а резистентность вируса будет иметь слабое негативное влияние на достижение Арменией целей стратегии ЮНЭЙДС «95–95–95». Исследование было осуществлено на выборке 982 ВИЧ-инфицированных пациентов и позволило определить ЛУ ВИЧ-1 у более чем 20% граждан страны с диагнозом «ВИЧ-инфекция».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Saadat V.M. HIV risks, testing, and treatment in the former Soviet Union: challenges and future directions in research and methodology. *Cent. Asian J. Glob. Health.* 2015;4(2):225. DOI: <https://doi.org/10.5195/cajgh.2015.225>
2. Kelly S.L., Shattock A.J., Kerr C.C., et al. Optimizing HIV/AIDS resources in Armenia increasing ART investment and examining HIV programmes for seasonal migrant labourers. *J. Int. AIDS Soc.* 2016;19(1):20772. DOI: <https://doi.org/10.7448/ias.19.1.20772>
3. National Center for AIDS Prevention. Biological and Behavioral Surveillance Survey on Armenia, Male, Seasonal Labor Migrants in Urban Communities in Armenia; 2018.
4. Mallitt K.A., Grigoryan S.R., Papoyan A.S., et al. Access to antiretroviral therapy and survival in Eastern Europe and Central Asia: a case study in Armenia. *J. Int. AIDS Soc.* 2014;17(1):18795. DOI: <https://doi.org/10.7448/ias.17.1.18795>
5. Vella S., Schwartländer B., Sow S.P., et al. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. *AIDS.* 2012;26(10):1231–41. DOI: <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e32835521a3>
6. Seble G.K., Geoffrey B., Jagadish C.S., et al. HIV-1 transmitted drug resistance surveillance shifting trends in study and prevalence estimates. *J. Int. AIDS Soc.* 2020;23(9):e25611. DOI: <https://doi.org/10.1002/jia2.25611>
7. WHO. HIV Drug Resistance Report 2017. Geneva; 2017.
8. Laga V., Vasilyev A., Lapovok I., et al. HIV type 1 subtype A1 dominates in Armenia. *Curr. HIV Res.* 2015;13(3):219–25. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570162x13666150407142834>
9. Осадчая О.А., Ерошкин П.В., Кириченко А.А. и др. Изучение передачи лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в Республике Армения с помощью биоинформатических методов. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2021;11(4):53–60. Osadchaya O.A., Eroshkin P.V., Kirichenko A.A., et al. Studying the transmission of HIV-1 drug resistance in the Republic of Armenia using bioinformatics methods. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items.* 2021;11(4):53–60. DOI: <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.4.53-60> EDN: <https://elibrary.ru/zylroa>
10. Kirichenko A., Kireev D., Lopatukhin A., et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries. *PLoS One.* 2022;17(1):e0257731. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257731>
11. Kirichenko A., Kireev D., Lapovok I., et al. Prevalence of pretreatment HIV-1 drug resistance in Armenia in 2017–2018 and 2020–2021 following a WHO survey. *Viruses.* 2022;14(11):2320. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14112320>

¹⁴ International Treatment Preparedness Coalition Monitoring the Procurement of Drugs for the Treatment of HIV Infection and HCV. Development of Solutions to Optimize the Situation in Order to Promote Uninterrupted Access to Drugs in the Republic of Armenia, 2018–2019. URL: https://itpc-ecca.org/wp-content/uploads/2019/11/Monitoring-zakupok-preparatov-Armeniya_2018-2019.pdf (дата обращения: 05.08.2022); .

Информация об авторах

Осадчая Ольга Алексеевна[✉] — м.н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, osadchaya96@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1543-5579>

Киреев Дмитрий Евгеньевич — к.б.н., н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Салеева Дарья Владиславовна — н.с., лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5870-5594>

Кириченко Алина Алексеевна — н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

Лаповок Илья Андреевич — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6328-1415>

Лопатухин Алексей Эдуардович — н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Шлыкova Анастасия Вениаминовна — н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Махмудова Лейла Фазировна — лаборант-исследователь лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0002-8168-9497>

Ладная Наталья Николаевна — к.б.н., с.н.с. Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2994-151X>

Овакимян Эрмис Мисаковна — зав. клиническим отделением ЗАО «Национальный центр инфекционных болезней», Ереван, Республика Армения

Мартоян Сирануш Вачиковна — врач-эпидемиолог ЗАО «Национальный центр инфекционных болезней», Ереван, Республика Армения, <https://orcid.org/0000-0002-2067-9503>

Казарян Овсеп Каралетович — к.б.н., н.с. ЗАО «Национальный центр инфекционных болезней», Ереван, Республика Армения, <https://orcid.org/0000-0001-5612-8933>

Овсепян Тамара Врежовна — зав. лабораторией ЗАО «Национальный центр инфекционных болезней», Ереван, Республика Армения

Саргсянц Нарина Константиновна — к.м.н., зам. директора ЗАО «Национальный центр инфекционных болезней», Ереван, Республика Армения

Покровский Вадим Валентинович — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. Специализированного научно-исследовательского отдела по профилактике и борьбе со СПИДом ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9514-7288>

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

Вклад авторов: *Осадчая О.А.* — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание; *Киреев Д.Е.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Салеева Д.В.* — сбор и обработка материала, редактирование; *Махмудова Л.Ф.* — сбор и обработка материала; *Лопатухин А.А.* — статистическая обработка, редактирование; *Кириченко А.А.*, *Лаповок И.А.*, *Шлыкova А.В.*, *Ладная Н.Н.*, *Покровский В.В.*, *Акимкин В.Г.* — редактирование; *Овакимян Э.М.*, *Мартоян С.В.*, *Казарян О.К.*, *Овсепян Т.В.*, *Саргсянц Н.К.* — сбор и обработка материала, редактирование. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.02.2024;
принята к публикации 20.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Olga A. Osadchaya[✉] — junior researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; osadchaya96@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1543-5579>

Dmitry E. Kireev — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Daria V. Saleeva — researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5870-5594>

Alina A. Kirichenko — researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

Ilya A. Lapovok — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6328-1415>

Alexey E. Lopatukhin — researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Anastasia V. Shlykova — researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Leila F. Makhmudova — laboratory assistant researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0002-8168-9497>

Natalia N. Ladnaya — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2994-151X>

Ermis M. Hovakimyan — Head, Clinical department, National Center for Infectious Diseases, Yerevan, Republic of Armenia

Siranush V. Martoyan — epidemiologist, National Center for Infectious Diseases, Yerevan, Republic of Armenia, <https://orcid.org/0000-0002-2067-9503>

Hovsep K. Kazaryan — Cand. Sci. (Biol.), scientific researcher, National Center for Infectious Diseases, Yerevan, Republic of Armenia, <https://orcid.org/0000-0001-5612-8933>

Tamara V. Hovsepyan — Head, Diagnostic laboratory, National Center for Infectious Diseases, Yerevan, Republic of Armenia

Narina K. Sargsyants — Cand. Sci. (Med.), deputy director, National Center for Infectious Diseases, Yerevan, Republic of Armenia

Vadim V. Pokrovsky — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head, Specialized research department for the prevention and control of AIDS, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9514-7288>

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

Author contribution: *Osadchaya O.A.* — collection and processing of material, statistical processing, editing; *Kireev D.E.* — research concept and design; *Saleeva D.V.* — collection and processing of material, editing; *Makhmudova L.F.* — collection and processing of material; *Lopatukhin A.A.* — statistical processing, editing; *Kirichenko A.A.*, *Lapovok I.A.*, *Shlykova A.V.*, *Ladnaya N.N.*, *Pokrovsky V.V.*, *Akimkin V.G.* — editing; *Hovakimyan E.M.*, *Martoyan S.V.*, *Kazaryan O.K.*, *Hovsepyan T.V.*, *Sargsyants N.K.* — collection and processing of material, 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 05.02.2024;
accepted for publication 20.03.2024;
published 29.04.2024



Изучение гуморального и клеточного иммунитета при иммунизации мышей линии C57Bl/6 прототипом инактивированной вакцины Чикунгунья

Отрашевская Е.В.¹, Каа К.В.², Оксанич А.С.¹, Мурашко Н.В.¹,
Куслий А.Г.³, Красько А.Г.⁴, Зверев В.В.¹, Игнатьев Г.М.¹

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

²Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова, Москва, Россия;

³«Вектор-Биальгам», Кольцово, Россия;

⁴Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Аннотация

Введение. Вирусная инфекция Чикунгунья является проблемой для системы здравоохранения эндемичных для этой инфекции регионов из-за отсутствия специфической профилактики и эффективных противовирусных препаратов. Доказана критическая роль клеточного иммунитета для контроля и клиренса вируса при лихорадке Чикунгунья. Эффективная стимуляция не только гуморального, но и клеточного иммунитета имеет неоспоримое значение при оценке эффективности потенциальной вакцины для профилактики данной инфекции.

Цель настоящей работы — изучение формирования протективного иммунитета после введения мышам линии C57Bl/6 препарата, содержащего инактивированный вирус Чикунгунья (ЧИКВ).

Материалы и методы. ЧИКВ (концентрации 10 и 40 мкг) вводили мышам внутримышечно дважды с интервалом 14 дней. Показатели гуморального иммунитета оценивали в иммуноферментном анализе и реакции нейтрализации, клеточного — по продукции интерферона- γ и пролиферации спленоцитов *in vitro*. Концентрацию цитокинов (интерлейкина-1, -2, -6, -10, -12p70 и фактора некроза опухоли) определяли методом иммуноферментного анализа. При оценке протективной активности животным в дорсальную поверхность стопы правой задней лапы вводили ЧИКВ в дозе $2,89 \pm 0,10$ Ig TCD₅₀ в объеме 20 мкл.

Результаты. Наиболее выраженный иммунный ответ отмечен на введение 40 мкг инактивированного ЧИКВ, что проявлялось в сбалансированной продукции исследованных цитокинов, формировании специфического гуморального и клеточного иммунитета. При оценке протективности отёк стопы у иммунизированных животных был достоверно ниже, чем у животных контрольной группы.

Обсуждение. Инактивированный бета-пропиолактоном ЧИКВ обладал выраженными иммуногенными свойствами. Баланс продукции про- и противовоспалительных цитокинов, а также Th1/Th2-иммунного ответа характеризовал формирование адаптивного иммунитета у мышей без выраженной воспалительной реакции. Продемонстрировано формирование специфического гуморального и клеточного иммунного ответа. Исследование протективности в нелетальной модели животных подтвердило эффективность инактивированного препарата.

Заключение. Двукратное введение мышам линии C57Bl/6 инактивированного препарата ЧИКВ в дозе 40 мкг продемонстрировало иммуногенность, что позволяет оценить его как перспективный профилактический препарат.

Ключевые слова: инактивированный вирус Чикунгунья, мыши линии C57Bl/6, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, цитокины

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 НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол №6 от 04.04.2023).

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

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

Для цитирования: Отрашевская Е.В., Каа К.В., Оксанич А.С., Мурашко Н.В., Куслий А.Г., Красько А.Г., Зверев В.В., Игнатьев Г.М. Изучение гуморального и клеточного иммунитета при иммунизации мышей линии C57Bl/6 прототипом инактивированной вакцины Чикунгунья. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):193–207.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-436>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-436>

Study of humoral and cellular immunity following the immunization of C57Bl/6 mice with a prototype of the inactivated Chikungunya vaccine

Elena V. Otrasheskaia^{1✉}, Konstantin V. Kaa², Alexey S. Oksanich¹, Nikita V. Murashko¹, Alexander G. Kusliy³, Anatoly G. Krasjko⁴, Vitaly V. Zverev¹, George M. Ignatyev¹

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

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

³Vector-Bialgam, Koltsovo, Russia;

⁴Republican Scientific-Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

Abstract

Introduction. Chikungunya virus infection is a problem for the health care system of affected regions due to the lack of specific prevention, as well as effective antiviral drugs. The critical role of cellular immunity in viral control and clearance for the Chikungunya fever has been demonstrated in many studies. Therefore, effective stimulation of not only humoral but also cellular immunity is of undeniable importance when assessing the effectiveness of a potential vaccine for the prevention of this infection.

The aim of the present study was to investigate the formation of protective immunity after administration of a drug containing inactivated Chikungunya virus (CHIKV) to C57Bl/6 mice.

Materials and methods. Inactivated CHIKV (concentrations of 10 µg and 40 µg) was administered intramuscularly to C57Bl/6 mice twice with an interval of 14 days. Indicators of humoral immunity were assessed by ELISA and neutralization test (NT), cellular immunity — by the production of IFN-γ and splenocyte proliferation *in vitro*. The concentration of cytokines IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF was determined by ELISA. When assessing the protective immunity in animals, CHIKV was injected into the dorsal surface of the foot of the right hind paw at a dose of 2.89 ± 0.10 lg TCD₅₀ in a volume of 20 µl.

Results. The most pronounced immune response was noted to the administration of 40 µg of inactivated CHIKV, which was manifested in the balanced production of the studied cytokines, the formation of specific humoral (according to the results of ELISA and NT) and cellular — specific proliferation of splenocytes *in vitro* and production of IFN-γ. When assessing efficacy, the development of foot edema in immunized animals was significantly lower than in animals in the control group.

Discussion. CHIKV, inactivated by beta-propiolactone, had pronounced immunogenic properties. The balance of production of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as the Th1/Th2 immune response, characterized the formation of adaptive immunity in mice without a pronounced inflammatory response. The formation of a specific humoral and cellular immune response has been demonstrated. A study of protection in a non-lethal animal model confirmed the efficacy of the inactivated vaccine.

Conclusion. Double administration of the inactivated CHIKV vaccine at a dose of 40 µg to C57Bl/6 mice demonstrated pronounced immunogenicity, which allows us to evaluate it as a promising prophylactic vaccine.

Keywords: *inactivated Chikungunya virus, mice C57Bl/6, humoral immunity, cell immunity, cytokines*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 6, April 4, 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: Otrasheskaia E.V., Kaa K.V., Oksanich A.S., Murashko N.V., Kuslij A.G., Krasjko A.G., Zverev V.V., Ignatyev G.M. Study of humoral and cellular immunity following the immunization of C57Bl/6 mice with a prototype of the inactivated Chikungunya vaccine. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):193–207. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-436> EDN: <https://www.elibrary.ru/qlerjf>

Введение

Глобальное внимание в последние десятилетия уделяется исследованиям вируса Чикунгунья (ЧИКВ) из-за его широкого географического рас-

пространения: страны Азии, страны Океании, Африка, Северная, Центральная и Южная Америка. Вирусная инфекция Чикунгунья является проблемой для системы общественного здравоохранения

эндемичных для этой инфекции регионов из-за отсутствия специфической профилактики, а также эффективных противовирусных препаратов. В 2004–2009 гг. внезапная эпидемия лихорадки Чикунгунья затронула 31 млн человек на полуострове Индостан [1, 2]. В 2013 г. ЧИКВ из нескольких стран Карибского бассейна быстро распространился в 45 странах Северной, Центральной и Южной Америки [3]. Летальность при лихорадке Чикунгунья невысокая, преимущественно среди новорождённых, а также пациентов с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем [1, 4]. Однако поражения скелетно-мышечной системы (артриты и артралгии) при лихорадке Чикунгунья нередко приводят к длительной утрате трудоспособности. Причиной артритического поражения суставов являются иммунно-опосредованные механизмы, запускающиеся выраженной продукцией провоспалительных медиаторов. Считается, что перенесённая инфекция ЧИКВ обеспечивает пожизненный иммунитет, повторные случаи инфицирования практически не регистрируются [5, 6]. Этот фактор, наряду с отсутствием специфической терапии как самой инфекции, так и её последствий, делает вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики лихорадки Чикунгунья. Также следует учитывать, что, помимо населения эндемичных по ЧИКВ стран, имеется контингент путешественников и специалистов, посещающих или работающих в эндемичных странах, но также существует риск появления эндемичных для ЧИКВ регионов и в развитых странах из-за изменения климата и других непредвиденных факторов, которые могут способствовать появлению и распространению инфекции. Тот факт, что Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США и Европейское медицинское агентство предоставили статус препарата «для быстрого продвижения и приоритета» (Fast Track/Priority Medicine) для нескольких кандидатных вакцин для профилактики заболевания, вызванного ЧИКВ, подтверждает актуальность проблемы и задачи по выводу на рынок эффективных препаратов для профилактики лихорадки Чикунгунья¹.

В 2023 г. в FDA была зарегистрирована вакцина Ixchiq (VLA1553) компании «Valneva»², разработанная на основе аттенуированного штамма ЧИКВ с делецией генов неструктурных белков [4]. Ряд потенциальных вакцин-кандидатов был протестиро-

ван на моделях животных в доклинических испытаниях (ДКИ), а также на людях в ходе клинических исследований [4, 7]. На данном этапе завершена I стадия клинических исследований³ инактивированной вакцины, разработанной индийскими учёными, которая показала достаточную иммуногенность на лабораторных животных [8]. Однако на рынке не зарегистрирована ни одна инактивированная вакцина для профилактики лихорадки Чикунгунья, что делает задачу её разработки актуальной. Технология производства инактивированных вакцин является традиционной и успешной для большого количества вирусных вакцин. Данная технологическая платформа считается одной из наиболее безопасных [4, 8–11], и разработка препарата не требует генетических манипуляций с вирусом. В небольших сравнительных исследованиях на мышах линии BALB/c продемонстрировано преимущество инактивированного бета-пропиолактоном препарата антигена ЧИКВ над формалин-инактивированным препаратом в формировании специфического гуморального и клеточного иммунитета [8, 9]. Ранее был продемонстрирован дозозависимый эффект формирования гуморального и клеточного иммунитета у мышей BALB/c на введение инактивированного бета-пропиолактоном антигена ЧИКВ [11].

Для приготовления экспериментального инактивированного препарата для профилактики лихорадки Чикунгунья на этапе наработки вируса нами были использованы гетероплоидные клетки линии 4647. Данная линия клеток получена в 1974 г. из почек взрослой зелёной мартышки. Созданный в 1983 г. банк клеток линии 4647 прошёл национальное лицензирование и на данном этапе полностью удовлетворяет рекомендациям Всемирной организации здравоохранения. Данная линия клеток получила разрешение для использования в производстве инактивированных вакцин [12]. Ранее была продемонстрирована возможность культивирования клеток 4647 на микроносителях в биореакторах [13]. В нашей стране зарегистрирована и производится вакцина для профилактики гепатита А «Альгавак М», в производстве которой используется данная линия клеток («Вектор-БиАльгам»). Также была показана высокая чувствительность линии клеток 4647, наряду с линией клеток Vero, к ЧИКВ [14].

Иммуногенность вакцин-кандидатов против ЧИКВ оценивается разработчиками не только с точки зрения формирования гуморального иммунитета, в виде «золотого стандарта» нейтрализующей активности специфических поствакцинальных

¹ Code of Federal Regulations. Title 21. Section 601.91. Approval based on evidence of effectiveness from studies in animals. Washington: FDA; 2020.

² FDA approves first vaccine to prevent disease caused by Chikungunya virus. U.S. Food and Drug Administration. Published November 9, 2023. Accessed November 12, 2023. URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-vaccine-prevent-disease-caused-chikungunya-virus>

³ Phase-I open label, dose-escalation clinical trial to evaluate the safety, tolerability and immunogenicity of chikungunya vaccine in healthy adults of 18 to 50 years age. 2017. Clinical Trials Registry—India, CTRI, Hyderabad. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04603131>

антител (АТ), но и с точки зрения формирования клеточного иммунитета, который крайне важен для клиренса вируса при лихорадке Чикунгунья [4, 8, 10]. Для экспериментального изучения лихорадки Чикунгунья основной моделью являются низшие приматы, т.к. они являются естественными хозяевами ЧИКВ в природе и патогенез заболевания имеет сходную с человеком картину. В качестве лабораторных животных на этапах ДКИ используют белых мышей различных линий. Взрослые иммунодефицитные мыши, как, например, мыши AG129, используются для моделирования летальной инфекции, а для нелетальной модели используются иммунокомпетентные мыши линии C57Bl/6, Swiss albino или BALB/c. Ранее J. Gardner и соавт. описали нелетальную модель инфекции ЧИКВ, при которой у мышей линии C57Bl/6 развивались симптомы, схожие с поражением суставов у человека, а также развитием вирусемии в течение 4–5 дней. При заражении ЧИКВ в дорсальную сторону стопы, у мышей линии C57Bl/6 развивался периметадорсальный отёк с максимумом на 3–7-е сутки, также отмечалось развитие артрита, тендинита и фасциита, что подтверждалось гистологическими данными остро-го и персистирующего воспаления [15, 16]. Данная модель нередко используется для оценки протективности разрабатываемых вакцинных препаратов против ЧИКВ [17–20]. Нами также была проведена заражение мышей в стопу для оценки протективности инактивированного препарата для профилактики лихорадки Чикунгунья. Для оценки иммуногенности кандидатной инактивированной вакцины мы изучали гуморальный и клеточный иммунитет у мышей линии C57Bl/6 после двукратной иммунизации разными дозами препарата, а также протективность препарата *in vivo*. Поскольку нормальное функционирование иммунной системы строится на балансе Th1 и Th2, основанном на продукции ими регуляторных цитокинов, мы дополнительно изучали концентрацию отдельных цитокинов в сыворотке иммунизированных животных в динамике.

Целью работы было изучение формирования протективного иммунитета после введения мышам линии C57Bl/6 препарата, содержащего ЧИКВ.

Материалы и методы

В экспериментах был использован штамм *Nika2021*, полученный из коллекции вирусов филиала СПБНИИВС ФМБА России в Никарагуа. Методика изоляции и пассирования штамма ЧИКВ описана ранее [21]. Нуклеотидная последовательность штамма ЧИКВ *Nika2021* представлена в GenBank, acc.no OQ320495.

Клетки линии 4647 (производственный банк «Вектор-БиАльгам») культивировали в среде Игла MEM («БиолоТ») с 5% эмбриональной телячьей сывороткой («БиолоТ»).

В исследовании использовали мышей линии C57Bl/6 (гаплотип H-2^b) обоего пола массой 12–14 г. Животные были получены из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА. 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 НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 04.04.2023).

Препарат

Наработку штамма *Nika2021* ЧИКВ проводили в линии клеток 4647 при роллерном культивировании, используя множественность заражения 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку. Инактивация осуществлялась бета-пропиолактоном (в соотношении 1 : 1000) при постоянном перемешивании в течение 48 ч при 5°C. Инактивированная вирусосодержащая жидкость была сконцентрирована в 50 раз методом ультрафильтрации (концентратор «Vivaflow 100» («Sartorius»)). Для очистки инактивированного вирусного концентрата использовали метод эксклюзионной хроматографии (сорбент Sepharose-6FF («GE Healthcare»)). Контроль полученного препарата ЧИКВ осуществляли по показателям: стерильность, pH, отсутствие эндотоксинов, содержание остаточной ДНК клеток 4647 согласно методам, изложенным в Государственной фармакопее⁴. Препарат стерилен, эндотоксины отсутствовали, содержание остаточной ДНК клеток 4647 < 5 нг/мл, pH 7,4. Концентрацию инактивированного ЧИКВ определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя набор «БиоСкрин-Чикунгунья (Ag)» («Биосервис»). Полученный инактивированный препарат в концентрациях 10 и 40 мкг антигена был сорбирован на гидроксиде алюминия (Al(OH)₃, «Brenntag SE»). Содержание Al(OH)₃ в конечной дозе препарата составляло 0,5 мг на дозу (0,5 мл). Дозы 10 и 40 мкг были использованы в связи с тем, что ранее этими дозами иммунизировали мышей линии BALB/c (гаплотип H-2^d) и оценивали содержание специфических АТ в сыворотке крови в динамике [14]. В указанных экспериментах доза препарата, содержащего 10 мкг антигена ЧИКВ, при двукратном введении вызвала незначительный (минимальный) подъём специфических АТ в группе животных после 2-й иммунизации с падением к 35-му дню наблюдения. В сыворотке животных, привитых дважды дозой 40 мкг антигена ЧИКВ, уже через 7 дней после пер-

⁴ Ф.С.3.3.1.0029.15. Вакцина для профилактики гепатита А культуральная, очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая. Государственная фармакопея Российской Федерации. М.; 2018. Т. 4.

вой иммунизации отмечался подъём специфических АТ, которые сохранялись до 35-го дня [14].

В связи с имеющимися данными для проводимого исследования были выбраны те же концентрации антигена. В качестве препарата контроля использовали $Al(OH)_3$ в концентрации 0,5 мг на объём введения (0,5 мл).

Методы исследования

ИФА определения титра АТ (IgG) к ЧИКВ проводили, как описано ранее [14]. Образцы тестируемых сывороток разводили 1 : 200 и далее шагом «2» до 1 : 12 800 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Каждое разведение сыворотки оценивали в 3 повторах. Положительным считалось разведение сыворотки, которое превосходило более чем в 2 раза показатель фона. В качестве отрицательного контроля использовалась сыворотка, полученная от мышей до иммунизации.

Реакцию нейтрализации (РН) проводили, как описано ранее [11], на 96-луночных планшетах с использованием культуры клеток Vero и штамма *Nica2021* в дозе 100 ТЦД₅₀. Полученный результат переводили в \log_2 для статистической обработки.

Исследование пролиферативной активности спленоцитов осуществляли фотометрическим методом по ранее описанной методике [14, 25]. Для стимуляции пролиферативной активности спленоцитов использовали следующие антигены: антиген ЧИКВ, инактивированный бета-пропиолактоном (5 мкг/мл); антиген вируса гепатита А (ВГА), используемый для производства вакцины «Альгавак-М» (5 мкг/мл), а также следующие митогены: конканавалин А (КонА; «ICN»; 5 мкг/мл) и липополисахарид (ЛПС) *Salmonella typhimurium* («Sigma»; 5 мкг/мл). Каждый антиген и митоген использовали для стимуляции спленоцитов животных *in vitro* в 4 повторах. ФСБ использовали в качестве контроля.

Определение продукции интерферона- γ (ИФН- γ) спленоцитами мышей *in vitro*. Спленоциты мышей были помещены в лунки 24-луночных планшетов в концентрации 2×10^6 клеток/мл. К клеткам добавляли антигены ЧИКВ и ВГА в концентрациях 5 мкг/мл для стимуляции продукции ИФН- γ . В качестве положительного контроля стимуляции продукции ИФН- γ использовали КонА («ICN»; 5 мкг/мл), в качестве «отрицательного» контроля использовали ФСБ. Клетки культивировали в течение 48 ч в условиях 5% CO_2 при 37°C. По окончании культивирования собирали культуральную жидкость активированных и контрольных клеток и определяли концентрацию ИФН- γ , используя набор для мышей («R&D Systems»).

Определение концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей — интерлейкинов ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12p70, а также фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), ИФН- γ — прово-

дили с использованием наборов для мышей («R&D Systems») согласно прилагаемым инструкциям.

Для **оценки протективности** проводили тест, как описано ранее [15]. Животным в дорсальную поверхность стопы правой задней лапы вводили ЧИКВ в дозе $2,89 \pm 0,10 \lg$ ТЦД₅₀ в объёме 20 мкл. Для контроля специфичности отёка в стопу задней левой лапы вводили 20 мкл 0,9% раствора для инфузий NaCl. Степень периметадорсального отёка оценивали на 6-й день. После измерений высоты и ширины электронным штангенциркулем в месте максимального отёка обеих стоп задних лап рассчитывали индекс отёка (ширина \times высота заражённой стопы/ширина \times высоты противоположной стопы). Для оценки вирусемии после заражения в сыворотке мышей определяли биологическую активность ЧИКВ путём титрования вируса в клетках линии Vero [14]. Результат титрования учитывали по выраженному цитопатическому действию и рассчитывали показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток (ТЦД₅₀), по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в \lg ТЦД₅₀/мл [23].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016». Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения среднего (SD), где это было приемлемо. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью t-критерия Стьюдента непарного, с двумя хвостами распределения (t-test). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Дизайн исследования

Животные были разделены на группы:

- группа А — 100 мышей, иммунизированных препаратом в дозе 40 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа В — 100 мышей, иммунизированных препаратом в дозе 10 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа С — 100 мышей, которым внутримышечно был введён препарат $Al(OH)_3$ на 0-е и 14-е сутки эксперимента.

Препарат вводили в бедренную мышцу внутримышечно, разделив 1 дозу на 2 введения, по 0,25 мл препарата в каждую конечность.

Животных наблюдали до 35 сут (21-е сутки после 2-й иммунизации). По 5 животных из каждой группы на 0-е сутки (до иммунизации), 14-е (до 2-й иммунизации), 21, 28 и 35-е сутки после начала иммунизации использовали для сбора образцов крови, которые были пулированы для дальнейшего определения содержания АТ двумя методами. У этих же животных выделяли селезёнку для дальнейшего получения суспензии спленоцитов. Спленоциты

использовали в исследованиях пролиферативной активности и продукции ИФН- γ по методикам, описанным выше. Ещё у 5 животных из каждой группы на 0, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 15, 17, 19, 21, 28 и 35-е сутки наблюдения производили забор крови из ретроорбитального синуса глаза и собирали индивидуальные образцы крови для последующего определения профиля цитокинов. Все образцы сыворотки крови после центрифугирования разливали по пробиркам в объёме 200 мкл и хранили при -70°C для последующего одномоментного исследования. Также на 35-е сутки 10 оставшихся мышей из каждой группы были использованы для оценки протективности кандидатного препарата в нелетальной модели, описанной ранее [15].

Все процедуры на отдельных мышках проводили вне визуального, аудиального или обонятельного контакта с другими животными. Работу с животными проводили в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS № 123 (Страсбург, 1986) и Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Результаты

Гуморальный иммунитет

Доза препарата, содержащего 10 мкг антигена ЧИКВ, вызывала незначительный и кратковременный подъем специфических АТ в ИФА после 2-й иммунизации животных группы «В» (табл. 1). В этой

группе животных максимальный уровень специфических АТ был в 4 раза ниже аналогичного в группе животных группы А. Введение препарата, содержащего 40 мкг антигена ЧИКВ, животным группы А привело к формированию достаточно высокого уровня специфических АТ на 14-й день после 1-й иммунизации, который вырос ещё в 4 раза после 2-й вакцинации к концу срока наблюдения (табл. 1).

В обеих группах вируснейтрализующие АТ были зарегистрированы на 14-й день после 1-й вакцинации и достигли максимальных значений после 2-й вакцинации (табл. 1). У животных группы В вируснейтрализующие АТ во всём периоде наблюдения были достоверно ниже ($p < 0,01$) показателя в группе животных А. В сыворотке животных группы С ни в одном из методов АТ не определялись.

Клеточный иммунитет

Влияние иммунизации инактивированным препаратом антигена ЧИКВ на формирование специфического клеточного ответа оценивали в реакции пролиферации спленоцитов и в продукции ИФН- γ после стимуляции антигенами. Использованные вирусные антигены (специфический ЧИКВ и гетерологичный ВГА) не вызывали подавления пролиферации спленоцитов *in vitro* на день «0» (рис. 1).

В ответ на стимуляцию митогенами (Кона и ЛПС) спленоцитов животных всех групп отмечена выраженная пролиферация, которая достоверно превосходила таковую при использовании вирусных антигенов во все сроки наблюдения ($p < 0,05$). Индекс стимуляции (ИС) спленоцитов животных в группе А был статистически выше, начиная с 7-го дня после 2-й иммунизации и до конца наблюдения, ($p < 0,005$ на 21-й и 28-й дни; $p < 0,05$ на 35-й день) относи-

Таблица 1. Показатели специфического гуморального иммунитета у мышей линии C57Bl/6, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ

Table 1. Specific humoral immunity indices in C57Bl/6 mice immunized with the preparation contained different CHIKV antigen dose

Группа Group	РН, \log_2 NT, \log_2	ИФА IgG, титр ELISA IgG, titer	РН, \log_2 NT, \log_2	ИФА IgG, титр ELISA IgG, titer	РН, \log_2 NT, \log_2	ИФА IgG, титр ELISA IgG, titer	РН, \log_2 NT, \log_2	ИФА IgG, титр ELISA IgG, titer	РН, \log_2 NT, \log_2	ИФА IgG, титр ELISA IgG, titer
	0-е сутки (1-я иммунизация) 0 day (1 st immunization)		14-е сутки (2-я иммунизация) 14 th day (2 nd immunization)		21-е сутки 21 st day		28-е сутки 28 th day		35-е сутки 35 th day	
A	Н. о. N. d.	Н. о. N. d.	4,80 \pm 0,14*	1 : 1600**	5,45 \pm 0,15*	1 : 3200**	6,84 \pm 0,18*	1 : 6400**	6,80 \pm 0,38*	1 : 6400**
B	Н. о. N. d.	Н. о. N. d.	2,16 \pm 0,18	1 : 200	2,20 \pm 0,18	1 : 400	3,12 \pm 0,10	1 : 400	2,20 \pm 0,10	1 : 200
C	Н. о. N. d.	Н. о. N. d.	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ по сравнению с группой В. Н. о. — не определяли. Забор крови для контроля специфического иммунитета на 0-е и 14-е сутки у животных проводили до вакцинации.

Note. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ in comparison with group В. N. o. — not detected. Animals were bled on days 0 and 14 for the specific immunity testing before antigen administration.

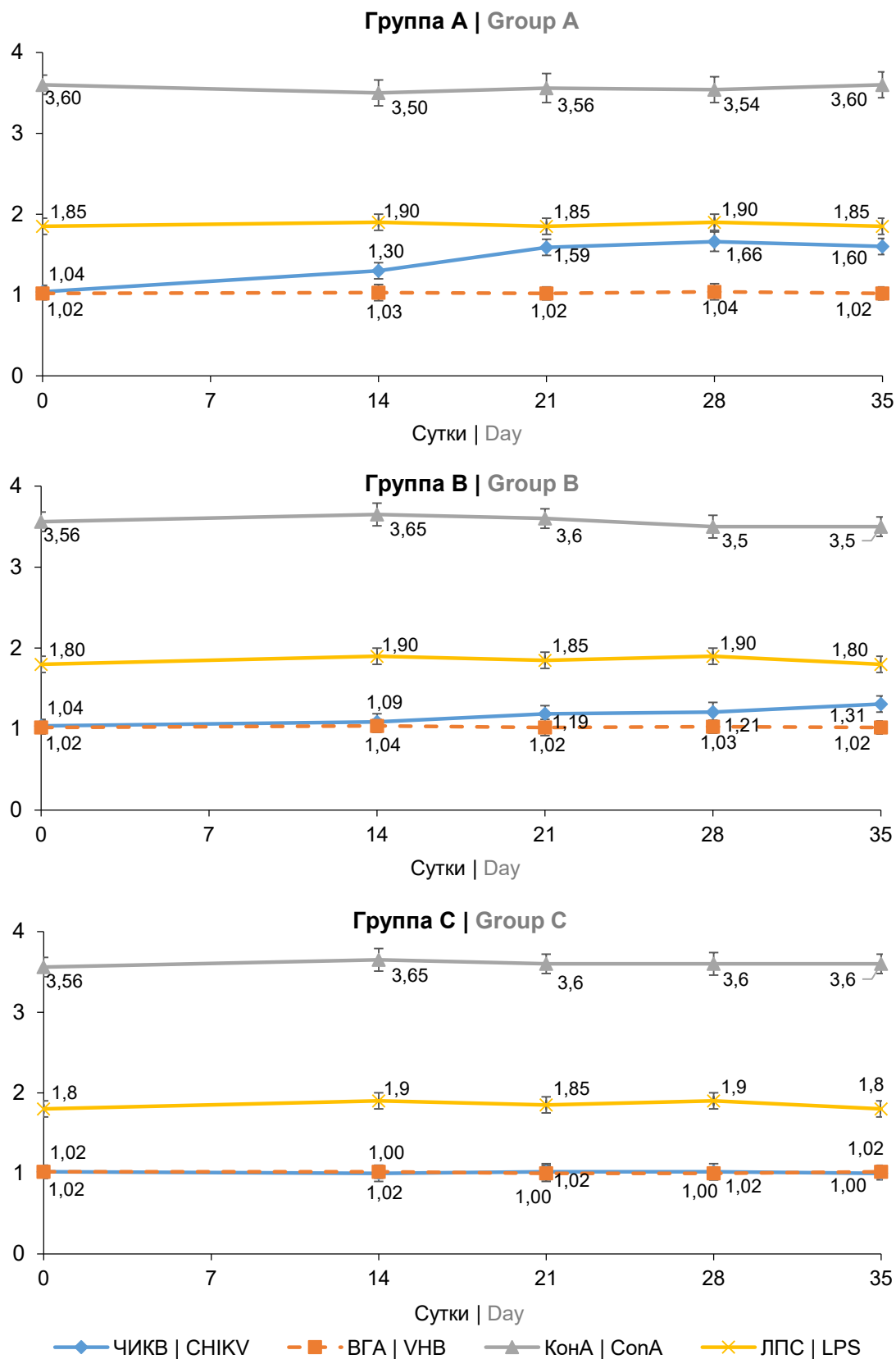


Рис. 1. Динамика индекса пролиферативной активности спленоцитов мышей линии С57В1/6, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ.

Fig. 1. Proliferative activity of splenocytes from С57В1/6 mice immunized with the preparation contained different CHIKV antigen dose in dynamics.

ConA — Conkanavalin A; LPS — lipopolysaccharide.

тельно аналогичных показателей у животных в группе В. Статистически достоверная разница между ИС спленоцитов антигеном ЧИКВ у животных групп А и В во все сроки наблюдения после 2-й иммунизации свидетельствует не только о специфичности пролиферативной реакции спленоцитов у иммунных животных, но и о дозозависимом эффекте. Спленоциты неиммунных животных группы С отвечали выраженной пролиферацией на стимуляцию только митогенами Т- и В-клеток (конканавалином А и липополисахаридом), при этом ИС не менялся при стимуляции вирусными антигенами во все сроки наблюдения (рис. 1).

Рост продукции ИФН- γ спленоцитами животных при их стимуляции специфическим антигеном (табл. 2) свидетельствует о формировании специфического клеточного иммунного ответа у вакцинированных животных.

Продукция ИФН- γ спленоцитами животных группы А достоверно превосходила таковые значения в группе В во всех сроках наблюдения ($p < 0,05-0,005$). У животных группы А повышенная продукция ИФН- γ спленоцитами сохранялась до 35-х суток наблюдения. Продемонстрирован дозозависимый эффект продукции ИФН- γ спленоцитами иммунных животных.

Концентрация цитокинов в сыворотке крови мышей

Введение $Al(OH)_3$ не приводило к достоверному увеличению концентрации ни одного из исследованных цитокинов в сыворотке крови мышей. Напротив, введение инактивированного антигена ЧИКВ приводило к увеличению концентрации исследуемых цитокинов как после 1-й, так и после 2-й вакцинации с максимальными подъёмами после 1-й иммунизации. Исключение составила продукция ИФН- γ . К 35-му дню после 1-й иммунизации продукция всех исследуемых цитокинов вернулась к исходным значениям (рис. 2–4).

Максимальный подъем концентрации ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12 в сыворотке крови мышей отмечался в 1-е сутки после 1-й иммунизации (рис. 2). Концентрация ИЛ-10 увеличилась практически в 4 раза относительно исходного уровня ($p < 0,0001$), т.е. в большей степени, чем концентрации ИЛ-6 и ИЛ-12, которые выросли почти в 2 раза ($p < 0,001$). Концентрация ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-6 у животных группы А, вакцинированных дозой 40 мкг, достоверно превосходила показатели у животных группы В, вакцинированных дозой 10 мкг, как после 1-й, так и после 2-й иммунизации ($p < 0,001$ для ИЛ-10, ИЛ-12 и $p < 0,005$ для ИЛ-6).

Таблица 2. Продукция ИФН- γ при стимуляции *in vitro* спленоцитов мышей линии C57Bl/6, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ

Table 2. Production of IFN- γ in response to splenocytes *in vitro* stimulation of C57Bl/6 mice, immunized with the preparation contained different CHIKV antigen dose

Группа Group	Антиген Antigen	Концентрация ИФН- γ , пкг/мл INF- γ concentration, pg/ml				
		0-е сутки (1-я иммунизация) 0 day (1 st immunization)	14-е сутки (2-я иммунизация) 14 th day (2 nd immunization)	21-е сутки 21 st day	28-е сутки 28 th day	35-е сутки 35 th day
А	ЧИКВ CHIKV	5,0 ± 0,4	12,8 ± 1,3**#	49,0 ± 4,2**#	57,0 ± 5,7**#	47,0 ± 2,7**#
	ВГА VNB	5,4 ± 0,9	4,8 ± 0,8	5,4 ± 0,9	5,0 ± 0,7	5,8 ± 0,4
	КонА Conkanavalin A	1066,0 ± 84,0	1110,0 ± 22,4	1269,0 ± 74,7	1093,0 ± 55,5	1125,0 ± 125,0
	ФСБ PBS	5,8 ± 0,4	5,4 ± 0,9	5,4 ± 0,9	5,0 ± 0,7	4,4 ± 0,5
В	ЧИКВ CHIKV	4,4 ± 0,5	6,8 ± 0,8	19,6 ± 3,6**	16,0 ± 1,6**	13,6 ± 2,7**
	ВГА VNB	5,0 ± 0,7	5,0 ± 0,7	5,4 ± 0,9	5,0 ± 0,7	5,4 ± 0,9
	КонА Conkanavalin A	1133,0 ± 90,9	1108,0 ± 36,8	1249,0 ± 57,3	1229,0 ± 27,0	1089,0 ± 73,7
	ФСБ PBS	5,9 ± 0,8	5,9 ± 0,8	5,0 ± 0,7	5,0 ± 0,7	4,4 ± 0,5
С	ЧИКВ CHIKV	5,0 ± 0,7	5,0 ± 0,7	5,4 ± 0,9	4,8 ± 0,8	4,8 ± 0,8
	ВГА VNB	5,0 ± 0,7	5,4 ± 0,9	4,8 ± 0,8	5,8 ± 0,4	5,4 ± 0,9
	КонА Conkanavalin A	1153,0 ± 29,5	1145,0 ± 94,2	1249,0 ± 35,8	1128,0 ± 56,6	1113,0 ± 46,6
	ФСБ PBS	5,0 ± 0,7	5,8 ± 0,4	5,4 ± 0,9	5,0 ± 0,7	5,8 ± 0,4

Примечание. * $p < 0,05$ относительно исходных показателей на 0-е сутки; * $p < 0,005$ относительно группы В; # $p < 0,05$ относительно группы С. Забор крови для контроля специфического иммунитета на 0-е и 14-е сутки у животных проводили до вакцинации.

Note. * $p < 0.05$ in comparison with day 0; * $p < 0.005$ in comparison to those in group В; # $p < 0.05$ in comparison to those in group С. Animals were bled on days 0 and 14 for the specific immunity testing before antigen administration.

Максимальный подъём концентрации ИЛ-1 β и ФНО- α в сыворотке крови мышей выявлен на 3-и сутки после 1-й иммунизации; $p < 0,001$ относительно исходного уровня (рис. 3). При этом концентрация ИЛ-1 β и ФНО- α у животных группы А, вакцинированных дозой 40 мкг, достоверно превос-

ходила показатели у животных группы В, вакцинированных дозой 10 мкг после 1-й ($p < 0,001$) и 2-й иммунизации ($p < 0,005$).

Максимальный подъём концентрации ИЛ-2 и ИЛ-4 отмечался на 7-й день после 1-й иммунизации (рис. 4). В группе А ИЛ-4 продемонстриро-

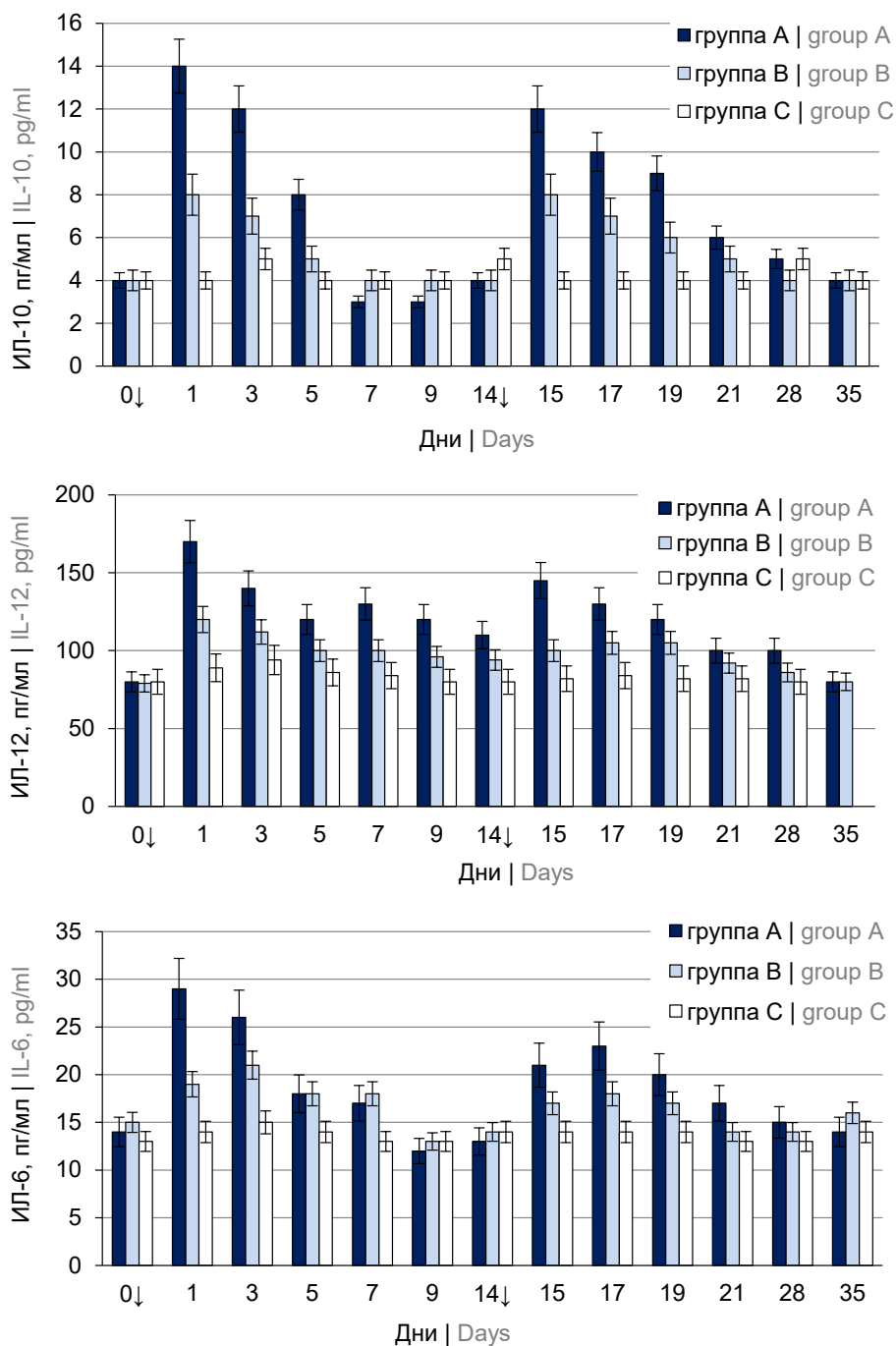


Рис. 2. Динамика уровня цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12 в сыворотке мышей линии C57Bl/6, иммунизированных инактивированным препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ.

Здесь и на рис. 3, 4: стрелка — день иммунизации; забор крови для контроля специфического иммунитета на 0-е и 14-е сутки у животных проводился до вакцинации.

Fig. 2. Dynamic of cytokines IL-6, IL-10, IL-12 in C57Bl/6 mice' sera immunized with the different doses of inactivated CHIKV. Here and on Figs. 3, 4: arrow — day of immunization; animals were bled on days 0 and 14 for the specific immunity testing before antigen administration.

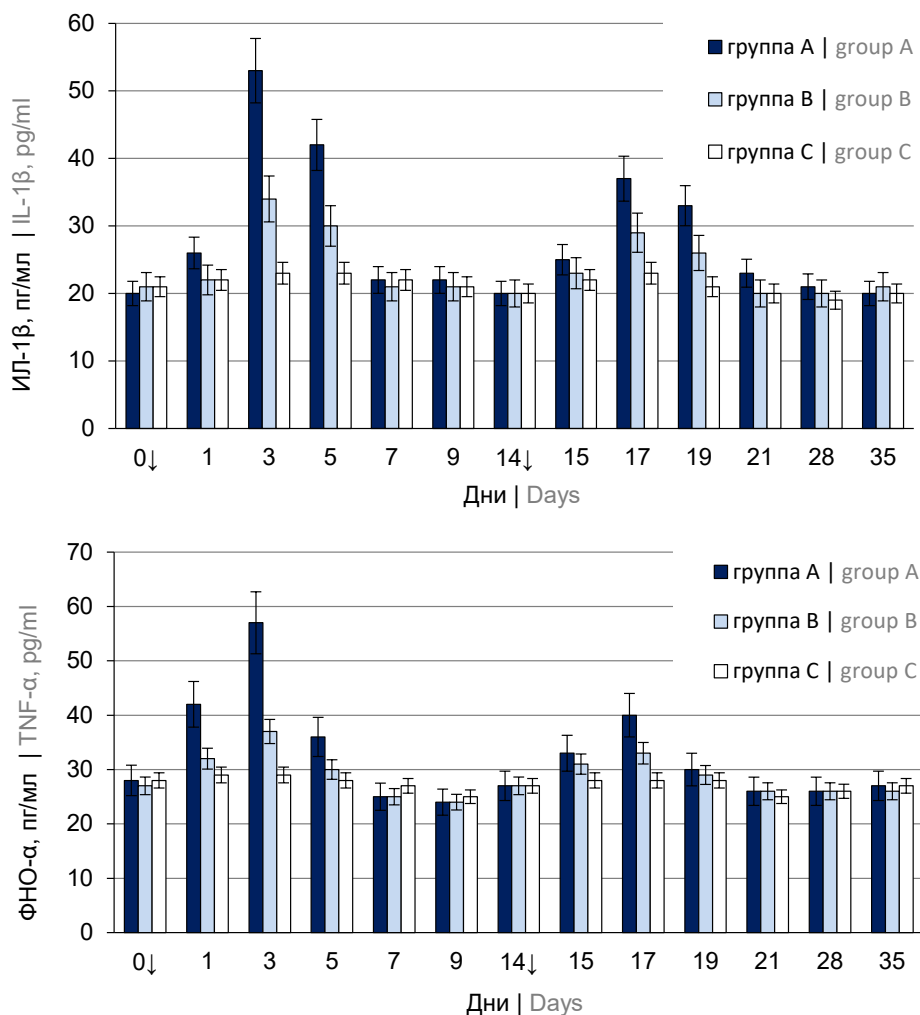


Рис. 3. Динамика уровня цитокинов ФНО- α и ИЛ-1 β в сыворотке мышей линии C57Bl/6, иммунизированных инактивированным препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ.

Fig. 3. Dynamic of cytokines TNF- α and IL-1 β in C57Bl/6 mice' sera immunized with the different doses of inactivated CHIKV.

вал практически 4-кратный прирост ($p < 0,0001$). Концентрации ИЛ-4 и ИЛ-2 у животных группы А, вакцинированных дозой 40 мкг, достоверно превосходили показатели у животных группы В, вакцинированных дозой 10 мкг, как после 1-й, так и после 2-й иммунизации ($p < 0,001$).

Следует отметить отличную от всех остальных цитокинов динамику ИФН- γ в обеих группах иммунизированных животных. Наблюдался очень умеренный подъем уровня ИФН- γ ($p < 0,05$) после 1-й иммунизации на 3–7-й дни и выраженный подъем (в 5 раз) после 2-й иммунизации ($p < 0,0001$) в группе А. В группе В подъема ИФН- γ после 1-й иммунизации практически не наблюдалось, а после 2-й иммунизации подъем был статистически достоверен ($p < 0,01$).

Максимальная концентрация ИФН- γ у животных группы А, вакцинированных дозой 40 мкг, достоверно превосходила таковую у животных группы В, вакцинированных дозой 10 мкг, после 2-й имму-

низации ($p < 0,0001$). Динамика продукции ИФН- γ в спленоцитах животных, описанная выше, также демонстрировала более значительный подъем уровня ИФН- γ после 2-й иммунизации животных в обеих группах.

Результаты оценки протективности кандидатной вакцины представлены в **табл. 3**. Следует отметить, что введение 0,9% раствора NaCl в стопу животного не сопровождалось нарастанием отека. По результатам измерений стопы рассчитывали индекс отека, который статистически достоверно различался между вакцинированными и невакцинированными животными; животные группы А имели статистически меньший индекс отека относительно такового у животных группы В.

Вирусемия наблюдалась в обеих точках наблюдения только в группе неиммунных животных группы С. В противоположность, в группе животных А, привитых максимальной дозой антигена ЧИКВ, вирусемия не определялась.

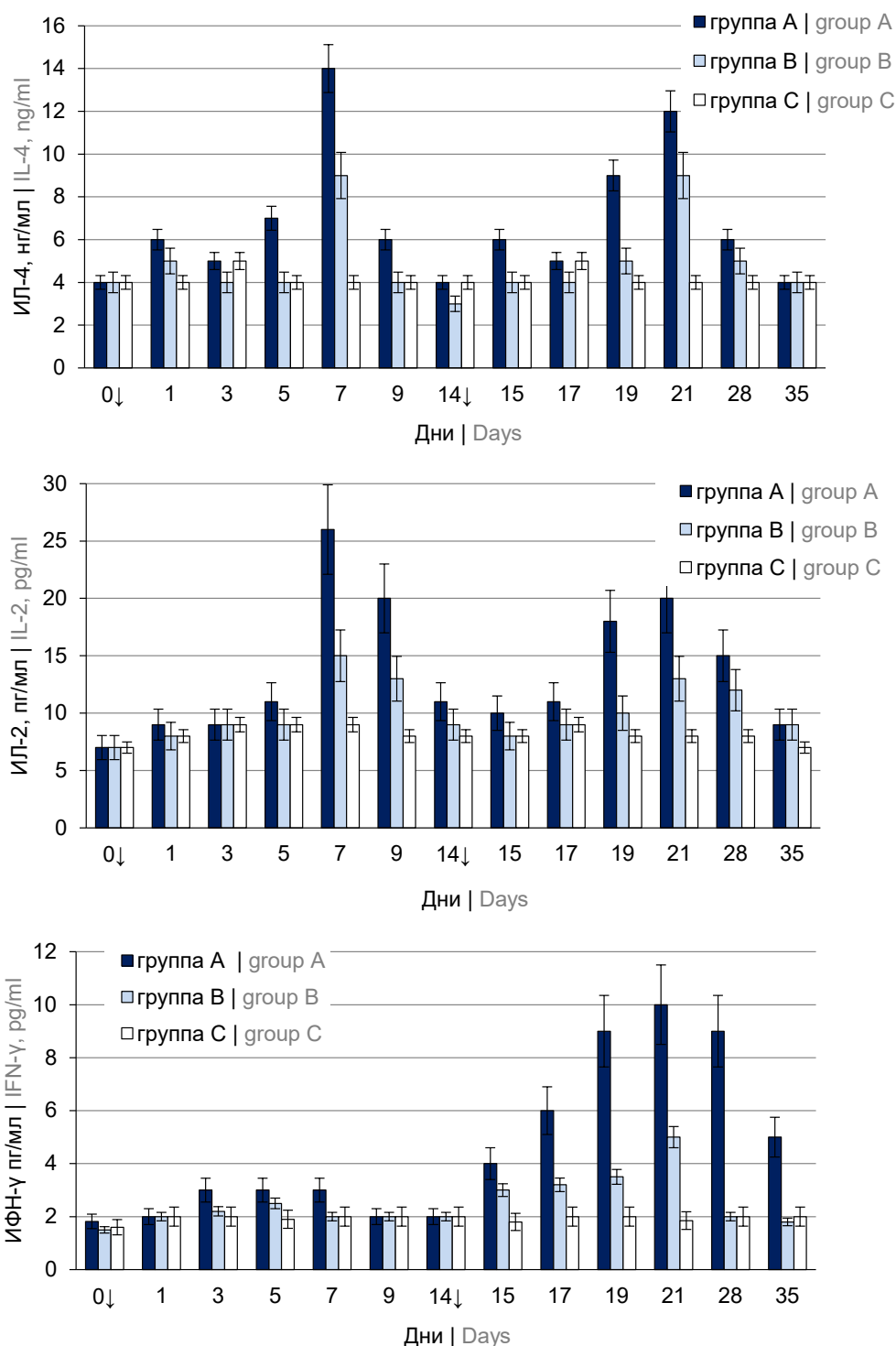


Рис. 4. Динамика уровня цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4 и ИФН-γ в сыворотке мышей линии C57Bl/6, иммунизированных инактивированным препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ.

Fig. 4. Dynamic of cytokines IL-2, IL-4 and IFN-γ in C57Bl/6 mice' sera immunized with the different doses of inactivated CHIKV.

Обсуждение

Пожизненный иммунитет и практическое отсутствие повторных случаев инфицирования, перекрёстная защита между разными штаммами ЧИКВ [2, 4–6] и отсутствие специфической тера-

пии инфекции делают вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики лихорадки Чикунгунья.

Признавая острую необходимость в эффективной вакцине и учитывая её отсутствие на рынке,

Таблица 3. Результаты оценки индекса отёка стопы и биологический титр ЧИКВ в сыворотке крови у мышей, дважды иммунизированных инактивированным препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ, после введения ЧИКВ в дозе $2,89 \pm 0,10 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$ в дорсальную поверхность стопы

Table 3. Feet swelling indices and CHIKV titres' in the mice' sera twice immunized with the different doses of inactivated CHIKV antigen measured after the CHIKV injection in a dose of $2,89 \pm 0,10 \text{ lg TCID}_{50}/\text{ml}$ into the dorsal part of foot

Группа Group	Индекс отёка Swelling index		Титр ЧИКВ, $\text{lg TCID}_{50}/\text{мл}$ CHIKV titer, $\text{lg TCID}_{50}/\text{мл}$	
	6-е сутки 6 th day		3-и сутки 3 th day	6-е сутки 6 th day
A	$1,2 \pm 0,21^{*#}$		Н.о. N.d.	Н.о. N.d.
B	$2,1 \pm 0,24$		$1,4 \pm 0,13^{*#}$	Н.о. N.d.
C	$3,04 \pm 0,21^{*}$		$4,3 \pm 0,18$	$1,8 \pm 0,18$

Примечание. * $p < 0,05$ относительно группы В; # $p < 0,005$ относительно группы С. Н.о. — не определялся (ниже порога чувствительности метода).

Note. * $p < 0.05$ in comparison with group В; # $p < 0.005$ in comparison with group С. N.d. — not detectable (lower threshold).

Всемирная организация здравоохранения оказывает поддержку странам в проведении эпиднадзора и борьбы с арбовирусами, в том числе с ЧИКВ⁵. С целью разработки эффективной вакцины используются различные стратегии и технологические платформы [4, 7]. Следует отметить, что безопасность инактивированных вакцин достижима исключительно за счёт затрат на организацию производства, соблюдения необходимых условий биобезопасности, а также постоянного контроля за полнотой инактивации вируса. Тем не менее такие преимущества инактивированных вакцин, как отсутствие риска реверсии вирулентности вакцинного штамма, а также стабильность самого препарата, что значительно упрощает и делает дешевле хранение и транспортировку, объясняет широкое использование технологической платформы для разработки вакцин. В настоящем исследовании продемонстрированы иммуногенные свойства инактивированного бета-пропиолактоном препарата для профилактики лихорадки Чикунгунья после двукратного введения мышам линии C57Bl/6. Иммуногенность кандидатного препарата подтверждена формированием специфического гуморального и клеточного иммунитета у лабораторных животных, а также сбалансированным ответом Т-хелперных клонов. Результаты, полученные нами в данном исследовании, сопоставимы с ранее описанными М. Tiwari и соавт. [8]. Максимальный прирост специфических АТ в реакции ИФА и РН, так же как и ИС спленоцитов *in vitro*, отмечен у животных, привитых обеими дозами препарата после двукратной иммунизации. Однако высокие титры специфических АТ и ИС спленоцитов сохранялись до конца срока наблюдения только в группе животных, привитых препаратом, содержащим 40 мкг антигена ЧИКВ. Дозозависимый эффект препарата был отмечен как при анализе титров специфических АТ и ИС спленоцитов *in vitro*, так и при анализе концентраций цитокинов в сыворотке мышей. Продук-

ция всех исследованных цитокинов как в сыворотке мышей, так и при стимуляции спленоцитов животных *in vitro* была максимальной в группе животных, привитых препаратом, содержащим 40 мкг антигена ЧИКВ. Исследования продукции цитокинов после введения инактивированного препарата для профилактики лихорадки Чикунгунья в открытых научных источниках, по нашим данным, отсутствуют. Однако крайне важно при проведении исследований убедиться, что формирующийся поствакцинальный иммунитет будет достаточно сбалансированным между Т-хелперными клонами, т.к. нормальное функционирование иммунной системы строится на балансе Th1 и Th2, основанном на продукции ими регуляторных цитокинов. Несбалансированность активации Т-хелперных клонов может приводить к развитию иммунопатологических состояний, которые в случае препарата, содержащего антиген ЧИКВ, имеет особое значение.

Из провоспалительных цитокинов первым прореагировал на введение вакцины — ИЛ-6. ФНО- α и ИЛ-1 β продемонстрировали умеренный подъём на 3-и сутки, а максимальный подъём ИЛ-2 был зарегистрирован на 7-е сутки после введения препарата. Выброс провоспалительных цитокинов уравновешивался значительным подъёмом противовоспалительных ИЛ-10 и ИЛ-4. Как известно, ИЛ-10 играет роль не только в контроле воспалительных реакций и ограничении чрезмерной реакции иммунитета, и появление его в первые дни также свидетельствует о стимуляции продукции ЧИКВ-специфических АТ [24, 25]. Были проведены интересные исследования роли ИЛ-10 на введение $\text{Al}(\text{OH})_3$ ИЛ-10-дефицитным мышам. Экспериментально было выявлено, что отсутствие передачи сигналов ИЛ-10 не ставило под угрозу индуцированную $\text{Al}(\text{OH})_3$ клеточную инфильтрацию в месте инъекции, но приводило к усилению антиген-специфического Th1-ответа после введения. $\text{Al}(\text{OH})_3$ усиливал транскрипцию и секрецию ИЛ-10 макрофагами и дендритными клетками. В целом эти результаты показали, что инъекция $\text{Al}(\text{OH})_3$ способствует выработке ИЛ-10, который может блокировать ответы Th1-иммунно-

⁵ Chikungunya. URL: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chikungunya>

го ответа [25]. ИЛ-4 также служит маркером активации Th2-субпопуляции лимфоцитов. В нашем исследовании, наряду с ИЛ-10, отмечен значительный рост ИЛ-4 на 7-е сутки после вакцинации. Достаточно выраженный Th2-клеточный иммунный ответ в нашем эксперименте можно объяснить не только эффективностью самого инактивированного антигена ЧИКВ, но и присутствием в препарате адьюванта — $Al(OH)_3$. До недавнего времени было известно, что адьюванты на основе $Al(OH)_3$ предпочтительно стимулируют Th2-клеточный иммунный ответ. Неоднократно продемонстрировано, что соли алюминия индуцируют Th2-клеточный ответ именно у мышей [8, 25]. Соли алюминия являются наиболее широко используемыми адьювантами почти столетие. Изначально считалось, что алюминий обеспечивает эффект депо, благодаря которому антиген медленно высвобождается с поверхности микрочастиц в месте введения, что позволяет антигенпрезентирующим клеткам постепенно использовать антиген. В последние годы было показано, что механизм действия солей алюминия в качестве адьюванта у человека не такой однозначный и является гораздо более сложным, чем предполагалось изначально. Факторы, оказывающие сильное влияние на реакцию иммунитета, вызываемую применением $Al(OH)_3$, включают скорость адсорбции, силу адсорбции, размер и однородность частиц $Al(OH)_3$, дозировку адьюванта и природу используемых антигенов [26, 27]. Текущее понимание механизма действия адьювантов на основе $Al(OH)_3$ включает, кроме эффекта репозитория, профагоцитарный эффект и активацию провоспалительного пути NLRP3. Всё это в совокупности стимулирует как врождённый, так и приобретённый иммунитет, а также активирует систему комплемента [26]. Демонстрирована секреция ИЛ-1 β и ИЛ-6 *in vitro*, которая значительно повышалась под действием $Al(OH)_3$ в моноцитах человека [28]. Соли алюминия индуцируют продукцию мочевой кислоты *in vivo*, что является необходимым фактором для инфильтрации воспалительных клеток [29]. В свою очередь повышенный уровень мочевой кислоты приводит к активации NLRP3 инфламмосомы и, таким образом, секреции ИЛ-1 β [29]. Более того, были идентифицированы два новых иммунологических значимых клеточных пути стимуляции моноцитов $Al(OH)_3$: первый — секреция ИФН I типа, потенциально индуцируемая TLR и/или NOD-подобной передачей сигналов; второй — представление антигенов HLA классов I и II, индуцированное ИФН- γ [30]. О функциональном состоянии Th1-субпопуляции принято судить по продукции иммунокомпетентными клетками ИФН- γ . Формирование специфического клеточного иммунитета у мышей после двукратного введения инактивированного антигена ЧИКВ в дозе 40 мкг в нашем исследовании

подтверждается данными ИС спленоцитов животных *in vitro*, что соответствует опубликованным данным [8, 11]. Пятикратный подъем концентрации ИФН- γ в сыворотке крови мышей после 2-й вакцинации также свидетельствует о стимуляции специфического клеточного иммунитета. За мощным выбросом ИЛ-10 в 1-е сутки после введения препарата мышам следовал рост продукции не только ИФН- γ , но и ФНО- α и ИЛ-2, которые также являются медиаторами Th1-клеточного ответа. Можно утверждать, что в нашем эксперименте путь введения и соотношение дозы антигена и $Al(OH)_3$ и, что более вероятно, именно сочетание антигена ЧИКВ и $Al(OH)_3$, привели к сбалансированному ответу про- и противовоспалительных цитокинов, а также стимуляции как гуморального, так и клеточного иммунитета.

Нами была использована нелетальная модель ЧИКВ-инфекции на мышах линии C57Bl/6, ранее не использованная отечественными разработчиками аналогичных препаратов, для исследования протективности инактивированного препарата. С помощью этой модели была продемонстрирована специфичность отёка лапы и транзитная вирусемия у неиммунных животных. У вакцинированных животных отёчность лапы была статистически менее значима, а вирусемия была зарегистрирована однократно только в группе животных, вакцинированных минимальной дозой. Данная нелетальная модель инфекции ЧИКВ у мышей позволила подтвердить эффективность разработанной кандидатной вакцины против ЧИКВ, которую можно объяснить в том числе балансом между Т-хелперными клонами, Th1 и Th2, что было подтверждено концентрациями регуляторных цитокинов в сыворотке иммунизированных животных.

Результаты представленного исследования иммуногенности препарата, содержащего инактивированный ЧИКВ, а также результаты исследования протективности данного препарата позволяют оценить его как перспективный для дальнейших исследований. Доза препарата 40 мкг/0,5 мл и двукратная схема иммунизации также может быть оценена как адекватная. Выбранная нами технологическая платформа позволяет достаточно быстро произвести вакцину для профилактики лихорадки Чикунгунья на линии клеток 4647.

Заключение

Двукратное введение мышам линии C57Bl/6 вируса ЧИКВ (инактивированного бета-пропиолактоном и очищенного, 40 мкг/0,5 мл) обеспечивало развитие специфического Th1/Th2-иммунного ответа — гуморального (АТ, обладающие вируснейтрализующим действием), клеточного (выраженная пролиферация спленоцитов *in vitro* и продукция ИФН- γ), а также сбалансированной продукцией

про- и противовоспалительных цитокинов. Исследование протективности в нелетальной модели животных подтвердило эффективность инактивированного препарата. Полученные результаты позволяют оценить препарат как перспективный для профилактики лихорадки Чикунгунья.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Weaver S.C., Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* 2015;372(13):1231–9. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmra1406035>
- Deeba D., Islam A., Kazim S. N., et al. Chikungunya virus: Recent advances in epidemiology, host pathogen interaction & vaccine strategies. *Pathog. Dis.* 2016;74(3):ftv119. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv119>
- Staples J.E., Breiman R.F., Powers A.M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49(6):942–8. DOI: <https://doi.org/10.1086/605496>
- Отрашевская Е.В., Трухин В.П., Меркулов В.А., Игнатъев Г.М. Прогресс в разработке вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья и перспективы появления на рынке. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(1):42–64. Otrashvskaya E.V., Trukhin V.P., Merkulov V.A., Ignat'ev G.M. Chikungunya vaccines: advances in the development and prospects for marketing approval. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(1):42–64. DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-42-64> EDN: <https://elibrary.ru/uoykrm>
- Galatas B., Ly S., Duong V., et al. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after Chikungunya emergence in a Cambodian Rural Community, April (2012). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(1):e0004281. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004281>
- Pierro A., Rossini G., Gaibani P., et al. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. *New Microbes New Infect.* 2015;7:23–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.04.002>
- Reyes-Sandoval A. 51 years in of Chikungunya clinical vaccine development: A historical perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019;15(10):2351–8. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1574149>
- Tiwari M., Parida M., Santhosh S.R., et al. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine.* 2009;27(18):2513–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.062>
- Kumar M., Sudeep A.B., Arankalle V.A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine.* 2012;30(43):6142–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.072>
- Rudd P.A., Raphael A.P., Yamada M., et al. Effective cutaneous vaccination using an inactivated Chikungunya virus vaccine delivered by Foroderm. *Vaccine.* 2015;33(39):5172–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.099>
- Игнатъев Г.М., Каа К.В., Антонова Л.П. и др. Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β-пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2021;98(5):519–27. Ignatyev G.M., Atrasheuskaya A.V., Antonova L.P., et al. Immunogenic properties of the preparation containing the Chikungunya virus antigen inactivated by β-propiolactone. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2021;98(5):519–27. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-159> EDN: <https://elibrary.ru/kezrsh>
- Миронова Л.Л., Конюшко О.И., Попова В.Д., Грачев В.П. К вопросу об использовании различных видов культур клеток в производстве противовирусных препаратов. *Успехи современного естествознания.* 2011;(12):43–5. Mironova L.L., Konushko O.I., Popova V.D., Grachev V.P. To the question about using various different types of cell cultures in the antiviral preparations' production. *Advances in Current Natural Sciences.* 2011;(12):43–5. EDN: <https://elibrary.ru/oiplor>
- Радаева И.Ф., Думченко Н.Б., Нечаева Е.А. Культивирование клеток на микроносителях в биореакторах. *Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология.* 2019;(2):22–32. Radaeva I.F., Dumchenko N.B., Nechaeva E.A. The cultivation of cells on microcarriers in bioreactors. *PNRPU Bulletin. Chemical Technology and Biotechnology.* 2019;(2):22–32. DOI: <https://doi.org/10.15593/2224-9400/2019.2.02> EDN: <https://elibrary.ru/vkxbiy>
- Каа К.В., Игнатъев Г.М., Синюгина А.А., Ишмухаметов А.А. Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(1):111–20. Каа К.В., Ignatyev G.M., Sinyugina A.A., Ishmukhametov A.A. Susceptibility of various cell lines to the Chikungunya virus and method selection for commercial-scale production of viral material. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(1):111–20. DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120> EDN: <https://elibrary.ru/kcmppz>
- Gardner J., Anraku I., Le T.T., et al. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J. Virol.* 2010;84(16):8021–32. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02603-09>
- Morrison T.E., Oko L., Montgomery S.A., et al. A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. *Am. J. Pathol.* 2011;178(1):32–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.018>
- Hallengård D., Kakoulidou M., Lulla A., et al. Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57Bl/6 mice. *J. Virol.* 2014;88(5):2858–66. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.03453-13>
- Arevalo M.T., Huang Y., Jones C.A., Ross T.M. Vaccination with a chikungunya virus-like particle vaccine exacerbates disease in aged mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019;13(4):e0007316. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007316>
- Slifka D.K., Raue H.P., Weber W.C., et al. Development of a next-generation chikungunya virus vaccine based on the HydroVax platform. *PLoS Pathog.* 2022;18(7):e1010695. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010695>
- Broeckel R.M., Haese N., Ando T., et al. Vaccine-induced skewing of T cell responses protects against Chikungunya virus disease. *Front. Immunol.* 2019;10:2563. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02563>
- Игнатъев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С. и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2020;97(3):227–32. Ignatyev G.M., Каа К.В., Oksanich A.S., et al. Indication and identification of Dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2020;97(3):227–32. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4> EDN: <https://elibrary.ru/ufhtab>
- Mayer U.B., Haller C., Haidinger W., et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect. Immun.* 2005;73(8):4810–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.8.4810-4817.2005>

23. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград;1962. Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research*. Leningrad;1962.
24. Rojas J.M., Avia M., Martín V., Sevilla N. IL-10: A multifunctional cytokine in viral infections. *J. Immunol. Res.* 2017;2017:6104054. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/6104054>
25. Oleszycka E., McCluskey S., Sharp F.A., et al. The vaccine adjuvant alum promotes IL-10 production that suppresses Th1 responses. *Eur. J. Immunol.* 2018;48(4):705–15. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201747150>
26. He P., Zou Y., Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015;11(2):477–88. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
27. Badran G., Angrand L., Masson J.D., et al. Physico-chemical properties of aluminum adjuvants in vaccines: Implications for toxicological evaluation. *Vaccine.* 2022;40(33):4881–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.064>
28. Vrieling H., Kooijman S., de Ridder J.W., et al. Activation of human monocytes by colloidal aluminum salts. *J. Pharm. Sci.* 2020; 109(1):750–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.014>
29. Eisenbarth S.C., Colegio O.R., O'Connor W., et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants. *Nature.* 2008;453(7198):1122–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06939>
30. Kooijman S., Brummelman J., van Els C.A.C.M., et al. Novel identified aluminum hydroxide-induced pathways prove monocyte activation and pro-inflammatory preparedness. *J. Proteomics.* 2018;175:144–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2017.12.021>

Информация об авторах

Отрашевская Елена Викторовна[✉] — в.н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия, e.v.otrashevskaja@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Каа Константин Владимирович — н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>

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

Мурашко Никита Валентинович — м.н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0002-9161-064X>

Куслий Александр Георгиевич — к.м.н., директор по качеству «Вектор-БиАльгам», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0732-9314>

Красько Анатолий Геннадиевич — к.м.н., в.н.с. Республиканской коллекции патогенных биологических агентов Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь, <https://orcid.org/0000-0002-2765-3525>

Зверев Виталий Васильевич — д.м.н., профессор академик РАН, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

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

Участие авторов: *Отрашевская Е.В.* — разработка дизайна исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов исследований, статистическая обработка, написание статьи; *Каа К.В.* — обсуждение дизайна исследования, обобщение результатов исследования, написание статьи; *Оксанич А.С.* — проведение исследований, анализ результатов; *Мурашко Н.В.* — проведение исследований, обобщение результатов исследования; *Куслий А.Г.* — обсуждение дизайна исследования, подготовка культур клеток, обсуждение результатов и текста статьи; *Красько А.Г.* — обсуждение дизайна исследования, проведение исследований, обсуждение результатов; *Зверев В.В.* — обсуждение концепции исследования, обобщение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи; *Игнатъев Г.М.* — обоснование концепции исследования, разработка дизайна исследований, непосредственное участие в выполнении работ, написание статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.02.2024;
принята к публикации 17.04.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Elena V. Otrachevskaja[✉] — leading researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, e.v.otrashevskaja@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Konstantin V. Kaa — researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>

Alexey S. Oksanich — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Nikita V. Murashko — junior researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0002-9161-064X>

Alexander G. Kusliy — Cand. Sci. (Med.), quality director, Vector-Bialgam, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0732-9314>

Anatoliy G. Krasko — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Republican collection of pathogenic biological agents, Republican Scientific-Practical Center of Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-2765-3525>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Full Member, scientific director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

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

Author contribution: *Otrachevskaja E.V.* — research design development, experimental research, analysis and interpretation of research results, statistical processing, article writing; *Kaa K.V.* — discussion of the research design, summarizing the research results, writing the article; *Oksanich A.S.* — experimental research, analysis of results; *Murashko N.V.* — experimental research, summarizing research results; *Kusliy A.G.* — discussion of the study design, preparation of cell cultures, discussion of the results and text of the article; *Krasko A.G.* — discussion of research design, conducting research, discussion of results; *Zverev V.V.* — discussion of the research concept, generalization of the research results, critical revision of the manuscript text; *Ignatyev G.M.* — substantiation of the research concept, development of research design, direct participation in the implementation of the work, writing 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 22.02.2024;
accepted for publication 17.04.2024;
published 29.04.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>



Влияние *Bacillus subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}

Морозова М.В.^{1✉}, Коркина В.И.², Макарова М.А.³, Литвинова Е.А.⁴

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия;

²Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий, пос. Краснообск, Россия;

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

Аннотация

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) — распространённая патология, которая не поддаётся полному излечению и требует пожизненной терапии. Использование пробиотиков рассматривают как один из перспективных и щадящих терапевтических подходов лечения ВЗК. В отличие от *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, представляющих основу большинства классических пробиотиков, спорообразующие *Bacillus* spp. лучше сохраняют жизнеспособность в условиях желудочно-кишечного тракта и выживаемость в период хранения пищевых продуктов, могут быть модуляторами иммунитета.

Цель работы — изучить влияние спор бактерий *B. subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}.

Материалы и методы. Самкам мышей *Muc2*^{-/-} на протяжении 2 мес добавляли в корм споры *B. subtilis* BS20 в количестве 10⁹ КОЕ. Анализ аминокислотного состава ткани бедренной мышцы выполняли методом капиллярного электрофореза. Концентрацию цитокинов в ткани толстой кишки изучали в мультиплексном анализе. Долю иммунных клеток в спленоцитах определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Добавление в корм спор *B. subtilis* BS20 способствовало увеличению продолжительности жизни и снижению потери массы тела у мышей-самок *Muc2*^{-/-}. В биоптатах нисходящей ободочной кишки выявлено снижение уровня провоспалительного цитокина интерлейкина-6 и повышение уровня интерлейкина-17, в спленоцитах — увеличение количества В-клеток и Т-хелперов.

Заключение. *B. subtilis* BS20 улучшает общее состояние мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}, оказывает противовоспалительное и иммуностимулирующее действие, снижая уровень цитокина интерлейкина-6 и повышая процент В-клеток и Т-хелперов в селезёнке.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, мыши *Muc2*^{-/-}, *Bacillus subtilis* BS20, пробиотики, провоспалительные цитокины

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен комитетом Научно-исследовательского института нейронаук и медицины по биоэтике (протокол № 3 от 19.05.2022).

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке за счёт средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований № 122042700001-9. Анализ цитокинов и иммунных клеток был поддержан грантом РФФИ № 20-64-47020.

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

Для цитирования: Морозова М.В., Коркина В.И., Макарова М.А., Литвинова Е.А. Влияние *Bacillus subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):208–216.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>

Effect of the *Bacillus subtilis* BS20 on physiological and immune parameters in mutant mice *Muc2*^{-/-}

Maryana V. Morozova^{1✉}, Valentina I. Korkina², Mariia A. Makarova³, Ekaterina A. Litvinova⁴

¹Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia;

²Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies, Krasnoobsk, Russia;

³Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

⁴Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

Abstract

Introduction. Inflammatory bowel disease (IBD) is a common pathology that cannot be completely cured and requires lifelong therapy. One of the promising and sparing therapeutic strategies is the use of probiotics. Unlike *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which represent the basis of most classical probiotics, *Bacillus* spp. are spore-forming bacteria that contributes to their resistance to the acidic environment of the stomach. It has been shown that the bacteria *Bacillus* spp. is an effective therapeutic drug for the relief of intestinal diseases with signs of inflammation and bacterial origin. Since the main factors causing IBD are dysbiosis and inflammation, and strains of *Bacillus* spp. as probiotics can be potential modulators of immunity and influence the intestinal microbiome, it is necessary to search for new strains of probiotic bacteria, including representatives of *Bacillus* spp., which have an effect on immunity and physiological indicators in experimental models of IBD.

The aim of the scientific research — to study the effect of *Bacillus subtilis* BS20 spores on the physiological and immune parameters of the mutant mouse line *Muc2*^{-/-}.

Research objectives: Investigate survival of *Muc2*^{-/-} mice, weight, immune parameters (cytokines and immune cells) and amino acid composition of muscles.

Materials and methods. *Muc2*^{-/-} females were fed spores of *Bacillus subtilis* BS20 in the amount of 10⁹ CFU for 2 months. Analysis of the amino acid composition of the femoral muscle was performed by capillary electrophoresis. The concentration of cytokines in the supernatant was measured using the Magnetic Luminex assay kit. Determination of the number of lymphocytes was performed by flow cytometry.

Results. The addition of *Bacillus subtilis* BS20 to the diet of mice reduced mortality and body weight loss in *Muc2*^{-/-} females. We found a decrease in interleukin-6 and an increase in interleukin-17 in the descending colon and an increase in B and T helper lymphocytes in the spleen.

Conclusion. *B. subtilis* BS20 improves the general condition of *Muc2*^{-/-} mutant mice, has an anti-inflammatory and immunostimulating effect, reducing the level of the cytokine interleukin-6 and increasing the percentage of B cells and T helper cells in the spleen.

Keywords: inflammatory bowel disease, mice *Muc2*^{-/-}, *Bacillus subtilis* BS20, probiotics, pro-inflammatory cytokines

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the Research Institute of Neurosciences and Medicine (protocol No. 3, May 19, 2022).

Funding source. The work was supported by federal budget funds for fundamental scientific research No. 122042700001-9. Analysis of cytokines and immune cells was supported by RSF grant No. 20-64-47020

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

For citation: Morozova M.V., Korkina V.I., Makarova M.A., Litvinova E.A. Effect of the *Bacillus subtilis* BS20 on physiological and immune parameters in mutant mice *Muc2*^{-/-}. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2024;101(2):208–216.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>

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

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) в настоящее время широко распространены, их ареал и число заболевших имеют тенденцию к росту. Если ранее ВЗК считались болезнью с наибольшей распространённостью в США и Европе, то в последнее десятилетие рост заболеваемости отмечен в странах Азии, включая Китай и Индию [1]. К ВЗК относят язвенный колит и болезнь Крона, для которых характерны хроническое воспаление и повреждение слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). К причинам возникновения ВЗК относят генетическую предрасположенность, диету, экологию, курение, иммунный статус, кишеч-

ные инфекции бактериальной этиологии [2]. Эффективного лечения ВЗК, приводящего к полному излечению [3], не разработано, а существующие терапевтические подходы имеют побочные эффекты. Поскольку для купирования воспалительного процесса требуется длительный и неоднократный приём антибиотиков, то для снижения количества нежелательных последствий важно использовать поддерживающую терапию. Одним из терапевтических направлений является использование пробиотиков, пребиотиков, симбиотиков и метаболитов бактерий. Поиск препаратов для поддерживающей терапии ВЗК ведут среди классических пробиотических штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [4–7].

В то же время спорообразующие *Bacillus* spp. могут иметь преимущество, поскольку более устойчивы к кислой среде желудка и, являясь аллохтонными, легко элиминируются из организма после прекращения применения [8]. Пробиотики на основе штаммов *Bacillus* spp. эффективны при лечении ВЗК инфекционной и неинфекционной этиологии [9–13].

Мыши мутантной линии *Muc2*^{-/-} имеют делецию гена *Muc2*, кодирующего протеогликан MUC2 (у мышей *Muc2*) — основной секреторный муцин бокаловидных клеток толстой кишки млекопитающих [2]. Белок *Muc2* создаёт слизистый барьер, который защищает эпителиальный слой кишечника от бактерий. Недостаточность слизистого слоя способствует прямому контакту бактерий с энтероцитами, что приводит к их воспалению. Нарушение синтеза *Muc2* в толстой кишке усиливает пролиферацию и уменьшает дифференцировку клеток, вызывает уплощение и изъязвление слоя эпителиальных клеток с потерей их архитектуры, что приводит к удлинению крипт, увеличению количества лейкоцитов и повышению проницаемости стенки кишки («синдром дырявого кишечника»). Данное патологическое состояние способствует развитию спонтанного колита, а впоследствии — колоректального рака [2]. Уменьшение синтеза *Muc2* в кишечнике может приводить к изменению бактериального состава микробиоты [14]. Мыши *Muc2*^{-/-} — это экспериментальная модель ВЗК, у которых на ранних этапах онтогенеза развиваются воспаление, диарея, пролапс кишки и гемоколит, снижается масса тела. В результате этого мыши склонны к гибели в более раннем возрасте, чем мыши с нормальной барьерной функцией кишки [15].

B. subtilis может повышать экспрессию протеогликана (MUC2), белков плотных контактов, оклюдина и противовоспалительных факторов, в результате чего сокращается потеря массы, сохраняется длина толстой кишки [11], а также способствует уменьшению воспаления, восстановлению слизистого барьера, индуцирует пролиферацию стволовых клеток кишечника, нормализует кишечную микробиоту [12, 13]. Добавление в рацион мышам *Muc2*^{+/-} спор *B. subtilis* BS20 способствовало нормализации поведения мышей и повлияло на экспрессию цитокинов в кишечнике, концентрацию серотонина и тирозина в крови [16].

ВЗК является патологией со сложной этиологией, поэтому необходимы их разносторонние исследования. Данных о механизме действия *Bacillus* spp. как пробиотика, особенно при ВЗК, недостаточно. В связи с этим требуются дополнительные исследования штаммов *Bacillus* spp. на экспериментальных моделях ВЗК.

Целью данной работы было изучение влияния спор *B. subtilis* BS20 на физиологические и

иммунные показатели мутантной линии мышей *Muc2*^{-/-}. Для достижения цели были поставлены задачи: определить эффект добавления в корм мышам *Muc2*^{-/-} штамма *B. subtilis* BS20 на продолжительность жизни, массу тела, иммунные показатели (цитокины и иммунные клетки в селезёнке) и аминокислотный состав мышц.

Материалы и методы

Работа была выполнена в Научно-исследовательском институте нейронаук и медицины (НИИИМ). В эксперимент были отобраны 9 6-месячных самок мышей *Muc2*^{-/-} в опытную группу и 6 в контрольную [17]. В качестве контроля при изучении уровня цитокинов были взяты 3 самки мышей линии C57BL/6. Животные содержались в открытых клетках при температуре 22–24°C и инвертированном световом режиме 12:12 ч. Доступ к воде и корму был свободным. В корм опытной группы на протяжении 2 мес добавляли суспензию спор штамма *B. subtilis* BS20 из коллекции бактериальных штаммов лаборатории НИИИМ в количестве 10⁹ спор/г корма. Экспериментальные исследования проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации и стандартами Надлежащей лабораторной практики (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 267), руководствами комитета Научно-исследовательского института нейронаук и медицины по биоэтике (протокол № 3 от 19.05.2022), и Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Используемые в работе мыши *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 имели SPF-статус (specific pathogen free — без видоспецифических патогенных микроорганизмов), который указан в рекомендациях Европейской федерации сотрудников, работающих с лабораторными животными, FELASA 2014 [18]. Статус здоровья мышей каждой линии подтверждали согласно рекомендациям FELASA 2014 [18].

Бактериальный штамм и условия роста

Культивирование на селективной среде с добавлением антибиотика канамицина обеспечивает рост выбранного штамма *B. subtilis* BS20 [16] и способствует точному подсчёту КОЕ в помёте мышей после прохождения через ЖКТ. Выросшие колонии пересевали на казеин-пептонный агар с дексторозой (DCPA, «Merck») и инкубировали при +37°C в течение 72–96 ч до перехода всех микробных клеток в спорую форму. Споры бактерий ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и добавляли в корм в количестве 10⁹ КОЕ [19].

Анализ количества спор *Bacillus subtilis* BS20 в корме и помёте мышей

Десять грамм корма гомогенизировали в 90 мл ФСБ, 100 мг помёта мышей — в 0,9 мл ФСБ с по-

следующим десятикратным серийным разведением для каждой пробы. Удаление вегетативных форм *B. subtilis* BS20 проводили нагреванием в течение 15 мин при 85°C. Для подсчёта количества спор использовали аликвоты каждого разведения в объёме 500 мкл. Посев производили на ДСРА, инкубировали в аэробных условиях при 36°C в течение 48 ч. Выживаемость спор в корме оценивали спустя 1 мес хранения. В помёте мышей количество спор определяли через 2 нед от начала эксперимента и через 1 мес после добавления спор в корм.

Определение уровня цитокинов

Для измерения уровня цитокинов биоптат нисходящего отдела толстой кишки гомогенизировали в жидком азоте. После добавления 100 мкл ФСБ образец центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Концентрацию цитокинов измеряли при помощи набора для мультиплексного анализа «Cloud-Clone» в соответствии с рекомендациями производителя. Детекцию цитокинов проводили на приборе «Luminex 200» («Merck») с xPONENT 3.1. программным обеспечением. Концентрацию цитокинов нормализовали к общему белку, который измеряли по Бредфорду и представляли в виде пг цитокина на 1 мг общего белка.

Определение доли спленоцитов

Биоптат селезёнки гомогенизировали при помощи пестикового ручного гомогенизатора («Sovtech»). Полученную суспензию клеток пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм («BD Falcon»). Определение количества CD25⁺Foxp3⁺CD4⁺-клеток проводили методом проточной цитометрии. Для окрашивания клеток 250 мкл суспензии инкубировали с антителами с FITC-anti-CD4, PE-anti-CD3ε, PE/Cy7-anti-CD8a and PE-anti-CD3ε, Pacific blue-anti-CD45, FITC-anti-CD19 и APC anti-CD25 («BioLegend») 30 мин при +4°C. Разбавляли клетки 100 мкл буфера для перемобилизации TrueNuclear Perm («BioLegend») и инкубировали с антителами AlexaFluor488 anti-Foxp3 («BioLegend») 60 мин в темноте при комнатной температуре. После промывки клетки разбавляли буфером для окрашивания до концентрации 1500–3000 клеток/мкл и инкубировали без света при температуре 4°C до анализа (1–2 дня) на проточном цитофлуориметре «BD FACSCanto II Flow Cytometer» («BD Biosciences»). В каждом образце анализировали 50 000 лимфоцитов. В спленоцитах выделяли одиночные клетки (синглеты) и одиночные CD4⁺-лимфоциты. Для анализа вычисляли процент CD45⁺CD3⁺-Т-клеток, CD45⁺CD3⁺CD4⁺-Т-хелперов, CD45⁺CD3⁺CD8⁺-Т-киллеров, CD45⁺CD19⁺-В-клеток, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-регуляторных Т-клеток и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-эффекторных Т-клеток.

Определение содержания аминокислот в составе белка бедренной мышцы

Капиллярный электрофорез выполняли на установке «КАПЕЛЬ-105М» («Люмэкс») с ультрафиолетовым детектором. От каждой мышцы брали по два 100 мг образца бедренной мышцы. Пробы анализировали с помощью картриджа с кварцевыми капиллярами длиной 75 см и внутренним диаметром 50 мкм («Люмэкс»). Определение содержания аргинина, лизина, тирозина, фенилаланина, гистидина, суммы лейцина и изолейцина, метионина, валина, пролина, треонина, серина, аланина и глицина проводили в фенилизотиоцианате производных аминокислот. Массовую долю триптофана определяли в жидкой фракции напрямую без получения производных фенилизотиоцианата. Обнаружение проводили при длине волны 219, давлении 30 мбар, напряжении +25 кВ. Внешний стандарт — коммерческая стандартная смесь аминокислот (LAA21-1KT, «Sigma Aldrich»). Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения «Эльфоран» («Люмэкс») [20].

Статистический анализ

Данные представлены в виде средних ± SEM для количественных значений и в долях (%) — для качественных. Распределение выявляли с помощью описательной статистики в «Statistica v. 10.0» с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Данные с ненормальным распределением оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни для независимых групп. Для категориальных переменных использовали точный тест Фишера. Значение $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты

Для определения жизнеспособности спор *B. subtilis* BS20 при прохождении через пищеварительный тракт исследовали количество жизнеспособных спор в содержимом кишечника самок *Muc2^{-/-}* и в корме через 1 мес от начала добавления в рацион животных. Количество жизнеспособных спор *B. subtilis* BS20 во всех образцах помета мышей составило 10⁷ КОЕ/г, в корме — в 10⁹ КОЕ/г.

Хроническое воспаление кишечника у мышей *Muc2^{-/-}* приводит к потере массы и гибели к возрасту 5–8 мес более 40% животных. В проведённом эксперименте к 8 мес выжили все мыши, получавшие с кормом *B. subtilis* BS20. В контрольной группе к 8 мес живыми осталось 55% (5 из 9) особей. Статистическая достоверность полученных результатов находилась на уровне тенденции ($p = 0,09$, точный тест Фишера), однако это следствие малого объёма выборки. Основными причинами падежа лабораторных животных в контрольной группе были пролапс кишки и заметная потеря массы тела.

Содержание аминокислот, %
Amino acid content, %

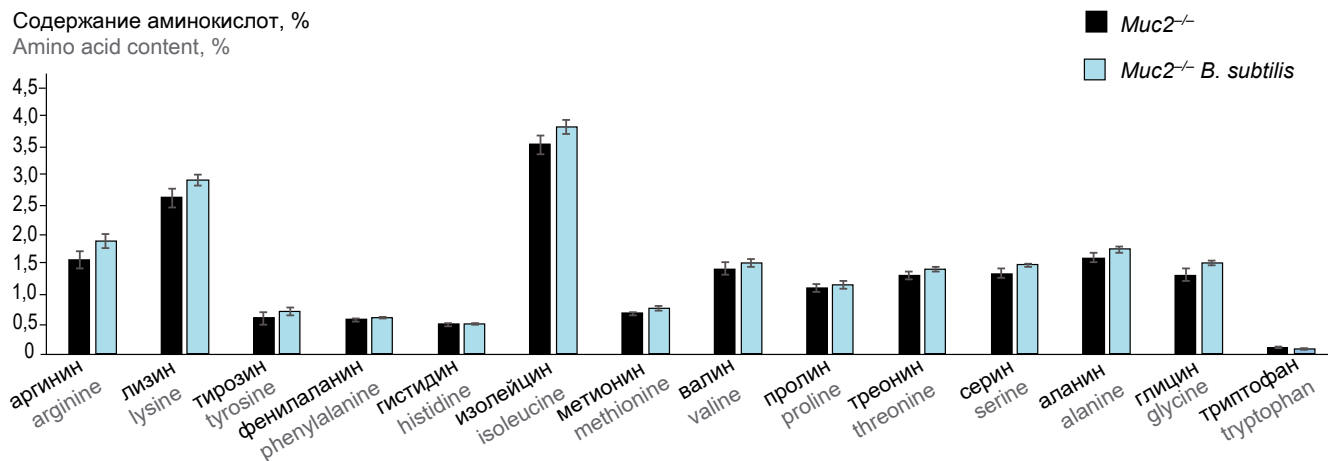
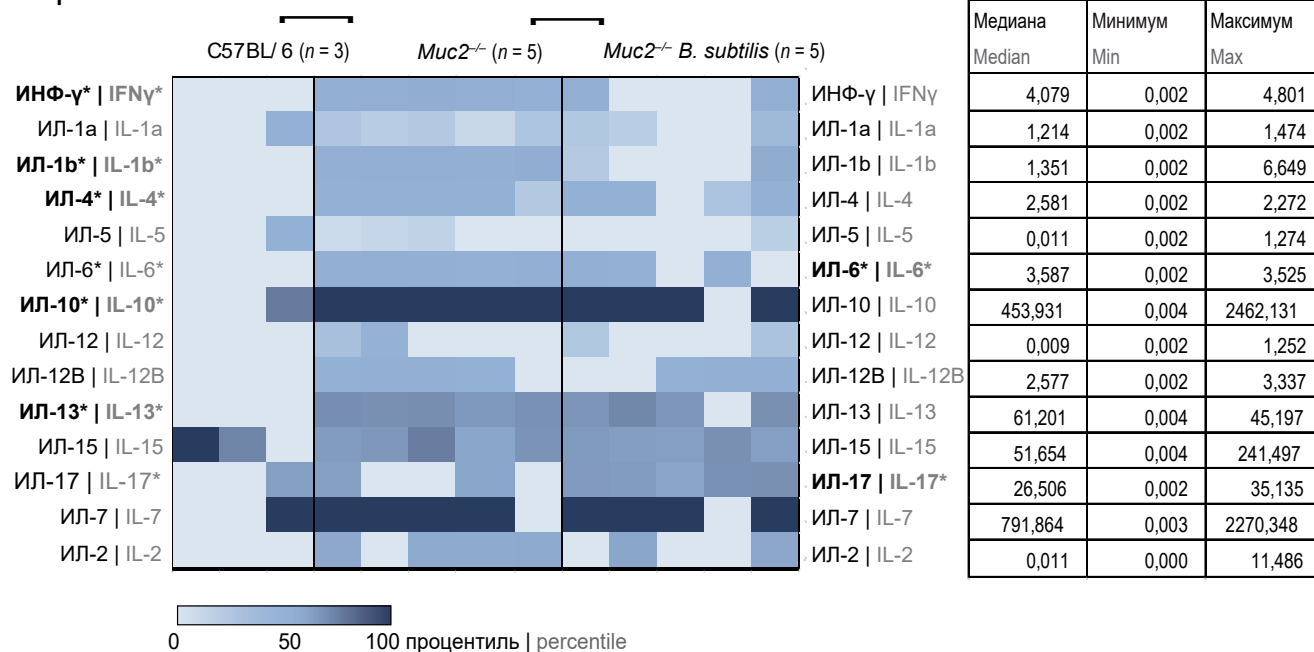


Рис. 1. Влияние добавления в корм спор *B. subtilis* BS20 на состав аминокислот в мышечной ткани бедра мышей *Muc2^{-/-}* ($n = 5$) и *Muc2^{-/-} B. subtilis* ($n = 6$).

Fig. 1. Effect of adding of *B. subtilis* BS20 spores to food on the composition of amino acids in the femoral muscle tissue of *Muc2^{-/-}* mice ($n = 5$) and *Muc2^{-/-} B. subtilis* mice ($n = 6$).

а | а



б | б

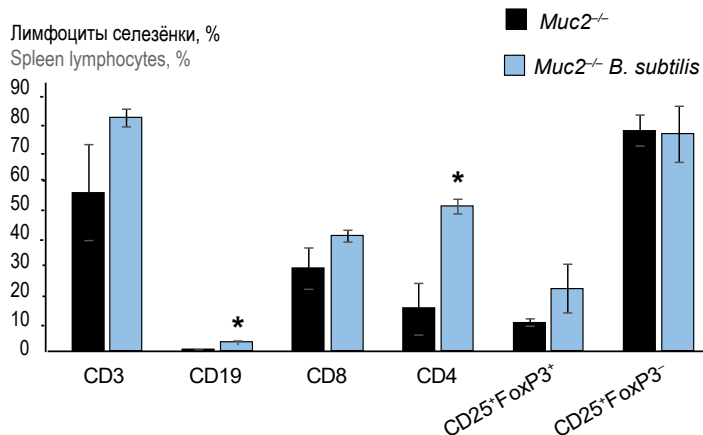


Рис. 2. Влияние спор *B. subtilis* BS20 на уровень цитокинов в толстой кишке (а) и долю иммунных клеток селезёнки (б) мышей *Muc2^{-/-}* в возрасте 8 мес.

* $p < 0,05$, U-тест Манна–Уитни. Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 2. Effect of of *B. subtilis* BS20 spores on the level of cytokine in colon (a) and percentage of the immune cells in spleen (b) of *Muc2^{-/-}* mice at 8 months.

* $p < 0.05$, Mann–Whitney U test. For a color version of the figure, see the journal's website.

Потеря массы тела мышей к 8 мес была значимо больше в контрольной группе ($p < 0,05$; $Z = -2,28$; $p < 0,01$, U-тест Манна–Уитни).

Достоверных различий в содержании 24 аминокислот (аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин, гистидин, изолейцин, метионин, валин, пролин, треонин, серин, аланин, глицин, триптофан) в сравниваемых группах не выявлено (рис. 1).

У самок мышей *Muc2*^{-/-}, содержащихся на обычном корме, в нисходящей ободочной кишке наблюдалось развитие воспаления и изменения профиля и уровней цитокинов интерферона- γ (ИФН- γ), интерлейкинов (ИЛ) 1b, 4, 6, 10, 13 по сравнению с показателями мышей линии C57BL/6 ($p < 0,05$; $Z = -2,23$; рис. 2, а).

Анализ уровня ИЛ-1a, 5, 12, 12b, 15, 17, 7, 2 не выявил различий между мутантами и мышами дикого типа (рис. 2, а). В группе мышей *Muc2*^{-/-}, получавшей с кормом споры *B. subtilis* BS20, отмечено снижение уровня ИЛ-6 и повышение значений ИЛ-17 по сравнению с мышами *Muc2*^{-/-}, находящимися на корме без добавок ($p < 0,05$). Уровни ИФН- γ , ИЛ-1a, 1b, 4, 5, 10, 12, 12b, 13, 15, 7, 2 сохранялись на прежних уровнях по сравнению с мутантами, содержащимися на обычном корме ($p > 0,05$).

В результате добавления в корм спор *B. subtilis* BS20 у *Muc2*^{-/-} отмечено достоверно значимое увеличение доли В-клеток (CD45⁺CD19⁺) и Т-хелперов (CD45⁺CD3⁺CD4⁺); $p < 0,05$ (рис. 2, б). Статистически значимых различий в количестве других лимфоцитов: Т-клетки (CD45⁺CD3⁺), Т-киллеры (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), регуляторные (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) и эффекторные (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻) Т-клетки после кормления спорами бактерий не выявлено.

Обсуждение

Пробиотики широко используют в терапии заболеваний ЖКТ. Они рассматриваются не только как средства коррекции кишечного дисбиоза, но и как перспективные инструменты иммуномодуляции. В отличие от неспороформирующих пробиотических штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, спорообразующие *Bacillus* spp. лучше сохраняют жизнеспособность в условиях ЖКТ и выживаемость в период хранения пищевых продуктов [8].

В результате проведенного нами исследования установлено, что штамм *B. subtilis* BS20 характеризуется достаточным пробиотическим эффектом [11], т. к. при прохождении через кислую среду желудка и все отделы кишечника мышей он сохранял стабильность, жизнеспособность и выживаемость в количестве 10^7 КОЕ, а в корме при хранении при комнатной температуре в течение месяца — 10^9 КОЕ.

Эффективность пробиотиков на основе бактерий *Bacillus* spp. неоднократно изучалась на различных моделях инфекционных и неинфекцион-

ных воспалительных заболеваний ЖКТ [9, 11–13]. В данном эксперименте установлено, что добавление в течение 2 мес спор штамма *B. subtilis* BS20 в корм мышам мутантной линии *Muc2*^{-/-}, используемой в качестве экспериментальной модели ВЗК, стабилизировало массу тела (по сравнению с массой тела мутантов, не употреблявших пробиотики, которая была ниже на 10%), обеспечивало 100% выживаемость к возрасту 8 мес и увеличивало продолжительность жизни на 30%. Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния *B. subtilis* на мышах инбредной линии BALB/c, чувствительных к желудочно-кишечным инфекциям [21].

Бактерии рода *Bacillus* способны активно продуцировать ряд ферментов, расщепляющих крахмал, целлюлозу, белки, жиры [9, 20], что может облегчать пищеварение и усвоение питательных веществ. В проведенном исследовании изменений в процентном содержании аминокислот в мышце бедра опытных мышей не обнаружено. Полученные результаты позволили предположить, что добавление в корм штамма *B. subtilis* BS20 не оказывает влияния на усвоение аминокислот.

Отсутствие нормальной слизистой оболочки у мышей *Muc2*^{-/-} приводит к развитию воспаления, симптоматика которого схожа с таковой у пациентов с язвенным колитом. Основными цитокинами, увеличение которых наблюдается при ВЗК у пациентов, являются фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), ИЛ-1b и -6. В.Д. Бец и соавт. [15] показали, что в сравнении с мышами C57BL/6 у линии *Muc2*^{-/-} увеличена экспрессия цитокинов ИФН- γ , ИЛ-1b, 4, 6, 10, 13, что подтверждает наличие у них хронического воспалительного процесса. В результате использования корма с добавлением спор *B. subtilis* BS20 у мышей *Muc2*^{-/-} выявлено снижение уровня ИЛ-6 и повышение уровня ИЛ-17, что свидетельствовало о противовоспалительной активности штамма. В исследованиях D. Liu и соавт. на крысах на высокожировой диете показано, что добавление спор *B. subtilis* приводило к снижению уровня ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-17 [22]. В работах G. Yi и соавт. установлено, что добавление *B. subtilis* в рацион мышам с химически индуцированным колитом способствовало снижению экспрессии ФНО- α , ИЛ-6, 17 и 23 [21]. Известно, что широко используемый в качестве пробиотика штамм *B. subtilis* DE111, в отличие от штамма *B. subtilis* BS20, не влияет на маркеры кишечного воспаления (ИЛ-6, секреторный иммуноглобулин А) [23].

В последние годы большое внимание привлекает цитокин ИЛ-17, продуцируемый преимущественно Т-хелперами, стимулирующий гранулоцитопоз и способствующий усилению антителозависимой гибели опухолевых клеток. Введение ИЛ-17 мышам, чувствительным к аутоиммунному увеиту (воспаление структур сосудистой оболочки глаза),

оказывало противовоспалительное действие [24]. В то же время известно, что ИЛ-17 может усугублять развитие воспаления и способствовать уменьшению числа Т-хелперов.

Изначально экспериментальная модель *Muc2*^{-/-} была создана для изучения колоректального рака. Начиная с 6-го месяца жизни у мышей этой линии формируются аденокарциномы по всей длине кишечника, к 1 году опухоли образуются у 100% особей [2]. В результате проведённого исследования показано, что после добавления *B. subtilis* BS20 в корм мышам *Muc2*^{-/-} увеличилось количество ИЛ-17 в сочетании с экспрессией Т-хелперов, что можно рассматривать как фактор снижения риска развития рака толстой кишки.

Селезёнка, являясь крупнейшим вторичным лимфоидным органом, отражает базовое состояние периферической иммунной системы. Выявленное повышение процента В-клеток и Т-хелперов в селезёнке в сочетании с повышением уровня ИЛ-17 у мышей, получавших с кормом споры *B. subtilis* BS20, свидетельствует об улучшении адаптационной реакции иммунной системы и переключении на антителообразование [25]. Поскольку у мышей *Muc2*^{-/-} отсутствует муциновая выстилка в кишечнике, соотношение и состав микробиоты у них меняется [17], кроме того, отсутствие муцинового барьера делает слизистую кишечника беззащитной перед патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Поскольку штамм *B. subtilis* BS20 стимулирует гуморальное звено иммунитета у мышей *Muc2*^{-/-}, возможно, это способствует развитию у них устойчивости к патогенным микроорганизмам и объясняет увеличение массы тела и продолжительности жизни. В предыдущих исследованиях показано, что мыши *Muc2*^{-/-} при кормлении неавтоклавируемым кормом, содержащим несколько видов представителей рода *Bacillus*, характеризовались лучшим репродуктивным индексом, более поздним появлением пролапса прямой кишки и высоким содержанием Т-хелперов в селезёнке, по сравнению с физиологическими и иммунологическими показателями мышей, получавших автоклавируемый корм, содержащий инактивированные споры бактерий [26]. Добавление в корм штамма *B. subtilis* DE111 способствует увеличению уровня регуляторных Т-клеток и Т-хелперов, наряду со снижением содержания Т-киллеров [23].

Заключение

Штаммы *B. subtilis* и их метаболиты являются непатогенными для человека, что позволяет считать их наиболее перспективными в качестве основы пробиотиков нового поколения. Большинство известных штаммов *B. subtilis* проявили себя как средство с многогранной клинической эффективностью и в настоящее время рекомендованы в

схемах терапии при лечении пациентов с дисбиозом кишечника различного генеза, хроническими заболеваниями пищеварительного тракта, после перенесённых острых кишечных инфекций, на фоне и после приёма антибиотиков, после проведения химиотерапии, на фоне длительной гормональной терапии, в условиях хронических стрессовых состояний, при нерациональной диетотерапии. Препараты на основе *B. subtilis* снижают выраженность диспептических расстройств, улучшают пищеварение, эффективно оказывают иммуномодулирующее действие и способствуют повышению качества жизни. С учётом того, что пробиотики, содержащие *B. subtilis*, не имеют противопоказаний и не вызывают побочных эффектов, сфера их применения постоянно расширяется [27, 28].

Таким образом, в научных работах последних десятилетий было сделано значительное продвижение в изучении спектра активности *B. subtilis*, в то же время для оценки терапевтической эффективности при ВЗК необходимы более длительные эксперименты.

Выводы

Таким образом, споры *B. subtilis* BS20 оказывают не только противовоспалительное действие в кишечнике мышей *Muc2*^{-/-}, подтверждающееся снижением уровня провоспалительного цитокина ИЛ-6, но и выступают как стимулирующее гуморальное звено иммунитета, повышая в селезёнке содержание В-клеток и Т-хелперов. Добавление спор бактерий в корм без изменений усвоения белков способствует увеличению продолжительности жизни, препятствуя потере массы тела у половозрелых самок *Muc2*^{-/-} мутантной линии мышей, являющихся экспериментальной моделью ВЗК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Mak W.Y., Zhao M., Ng S.C., Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2020;35(3):380–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/JGH.14872>
2. Милутинович К.С., Попов В.С. *Muc2*-дефицитные мыши как модель хронического воспаления. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2023;(3):118–26. Milutinovich K.S., Popov V.S. *Muc2*-deficient mice as a model of chronic inflammation. *Laboratory Animals for Science.* 2023;(3):118–26. DOI: <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-11> DOI: <https://elibrary.ru/pipxjk>
3. Маев И.В., Шельгин Ю.А., Скалинская М.И. и др. Патоморфоз воспалительных заболеваний кишечника. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2020;75(1):27–35. Maev I.V., Shelygin Yu.A., Skalinskaya M.I., et al. The pathomorphosis of inflammatory bowel diseases. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2020;75(1):27–35. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn1219> EDN: <https://elibrary.ru/fwjiao>
4. Ma X., Shin Y.J., Jang H.M., et al. *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium longum* alleviate colitis and cognitive impair-

- ment in mice by regulating IFN- γ to IL-10 and TNF- α to IL-10 expression ratios. *Sci. Rep.* 2021;11(1):20659.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00096-x>
5. Leccese G., Bibi A., Mazza S., et al. Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains counteract adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) virulence and hamper IL-23/Th17 axis in ulcerative colitis, but not in Crohn's disease. *Cells.* 2020;9(8):1824.
DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9081824>
 6. Wang T., Zhang L., Wang P., et al. *Lactobacillus coryniformis* MXJ32 administration ameliorates azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis-associated colorectal cancer via reshaping intestinal microenvironment and alleviating inflammatory response. *Eur. J. Nutr.* 2022;61(1):85–99.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02627-8>
 7. Hrdý J., Alard J., Couturier-Maillard A., et al. *Lactobacillus reuteri* 5454 and *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis 5764 improve colitis while differentially impacting dendritic cells maturation and antimicrobial responses. *Sci. Rep.* 2020;10(1):5345.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62161-1>
 8. Soares M.B., Martinez R.C.R., Pereira E.P.R., et al. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Res. Int.* 2019;125:108542.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108542>
 9. Suva M.A., Sureja V.P., Khani D.B. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: mechanism of action and clinical applications. *J. Curr. Res. Sci. Med.* 2016;2(2):65–72.
DOI: <https://doi.org/10.4103/2455-3069.198381>
 10. Червинец В.Ю., Червинец М.В., Ганзя Д.В. Применение пробиотиков в лечении дисбактериоза пищеварительного тракта. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2022;(4):94–100. Chervinets V.Yu., Chervinets M.V., Ganzya D.V. Application of probiotics in treatment of digestive tract dysbacteriosis. *Experimental and Clinical Gastroenterology Journal.* 2022;(4):94–100.
DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-200-4-94-100>
EDN: <https://elibrary.ru/oasmfj>
 11. Li Y., Zhang T., Guo C., et al. *Bacillus subtilis* RZ001 improves intestinal integrity and alleviates colitis by inhibiting the Notch signalling pathway and activating ATOH-1. *Pathog. Dis.* 2020;78(2):ftaa016.
DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa016>
 12. Luo R., Zhang J., Zhang X., et al. *Bacillus subtilis* HH2 ameliorates TNBS-induced colitis by modulating gut microbiota composition and improving intestinal barrier function in rabbit model. *J. Funct. Foods.* 2020;74:104167.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104167>
 13. Zhang X., Tong Y., Lyu X., et al. Prevention and alleviation of dextran sulfate sodium salt-induced inflammatory bowel disease in mice with *Bacillus subtilis*-fermented milk via inhibition of the inflammatory responses and regulation of the intestinal flora. *Front. Microbiol.* 2021;11:622354.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622354>
 14. Wu M., Wu Y., Li J., et al. The dynamic changes of gut microbiota in Muc2 deficient mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(9):2809.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19092809>
 15. Бец В.Д., Ачасова К.М., Борисова М.А. и др. Роль гликопротеина муцинов и L-фукозы во взаимодействии иммунитета и микрофлоры на примере экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника. *Биохимия.* 2022;87(3):356–75. Bets V.D., Achasova K.M., Borisova M.A., et al. The role of glycoprotein mucin 2 and L-fucose in the interaction of immunity and microflora of experimental model of inflammatory bowel diseases. *Biochemistry (Moscow).* 2022;87(3):356–75.
DOI: <https://doi.org/10.31857/s0320972522030046>
EDN: <https://elibrary.ru/caqkhs>
 16. Morozova M., Alekseev A., Saiedi A., Litvinova E. Normalization of deviant behavior in Muc2^{+/+} mice through dietary incorporation of *Bacillus subtilis* spores. *Prog. Microbes Mol. Biol.* 2023;6(1).
DOI: <https://doi.org/10.36877/pmmb.A0000386>
 17. Morozova M.V., Borisova M.A., Snytnikova O.A., et al. Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice. *Sci. Rep.* 2022;12(1):1–18.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19219-z>
 18. Mähler C.M., Berar M., Feinstein R., et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2014;48(3):178–92.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>
 19. Samokhin A., Korel A., Blinova E., et al. Delivery of *B. subtilis* into animal intestine using chitosan-derived bioresorbable gel carrier: preliminary results. *Gels.* 2023;9(2):120.
DOI: <https://doi.org/10.3390/gels9020120>
 20. Морозова М.В., Калмыкова Г.В., Акулова Н.И., Литвинова Е.А. Определение содержания бактерий рода *Bacillus* в корме и фекалиях лабораторных мышей при содержании в стерильных и нестерильных условиях. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2021;(3):11–6. Morozova M.V., Kalmykova G.V., Akulova N.I., Litvinova E.A. Analysis of *Bacillus* spp. in the diet and feces of laboratory mice under barrier-housing and non-sterile conditions. *Laboratory Animals for Science.* 2021;(3):11–6.
DOI: <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-03-02>
EDN: <https://elibrary.ru/ybolke>
 21. Gong Y., Li H., Li Y. Effects of *Bacillus subtilis* on epithelial tight junctions of mice with inflammatory bowel disease. *J. Interferon Cytokine Res.* 2016;36(2):75–85.
DOI: <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0030>
 22. Liu D., Chen P. Binary *Bacillus subtilis* protects the intestinal mucosa barrier and alleviates nonalcoholic steatohepatitis. *Anim. Model Exp. Med.* 2023.
DOI: <https://doi.org/10.1002/ame2.12337>
 23. Freedman K.E., Hill J.L., Wei Y., et al. Examining the gastrointestinal and immunomodulatory effects of the novel probiotic *Bacillus subtilis* DE111. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(5):2453.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22052453>
 24. Ke Y., Liu K., Huang G.Q., et al. Anti-inflammatory role of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *J. Immunol.* 2009;182(5):3183–90.
DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802487>
 25. Ishak N.I.M., Mohamed S., Madzuki I.N., et al. Limonin modulated immune and inflammatory responses to suppress colorectal adenocarcinoma in mice model. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2021;394(9):1907–15.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02101-6>
 26. Morozova M.V., Kalmykova G.V., Akulova N.I., et al. Autoclaved diet with inactivated spores of *Bacillus* spp. decreased reproductive performance of Muc2^{-/-} and Muc2^{+/-} mice. *Animals (Basel).* 2022;12(18):2399.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12182399/S1>
 27. Esparza-Gonzalez S.C., Troy A.R., Izzo A.A. Comparative analysis of *Bacillus subtilis* spores and monophosphoryl lipid A as adjuvants of protein-based *Mycobacterium tuberculosis*-based vaccines: Partial requirement for interleukin-17A for induction of protective immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014;21(4):501–8.
DOI: <https://doi.org/10.1128/cvi.00622-13>
 28. Lee J.E., Kye Y.C., Park S.M., et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens. *Vet. Res.* 2020;51(1):68.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00788-8>

Информация об авторах

Морозова Марьяна Владимировна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных моделей нейropsихиатрических нарушений НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия, morozova.maryana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3749-5214>

Коркина Валентина Игоревна — к.б.н., с.н.с. лаб. биохимии Сибирского федерального научного центра агроботехнологий, пос. Краснообск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9472-5787>

Макарова Мария Александровна — д.м.н., в.н.с., зав. лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Литвинова Екатерина Анатольевна — к.б.н., н.с., руководитель НОЦ «Технология биополимеров» Новосибирского государственного технического университета, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6398-7154>

Участие авторов: *Морозова М.В., Литвинова Е.А.* — проведение исследований, написание статьи; *Коркина В.И.* — анализ аминокислотного состава мышц; *Макарова М.А.* — редакторская правка. Все авторы прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 21.01.2024;
принята к публикации 28.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Maryana V. Morozova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental models of neuropsychiatric disorders, Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia, morozova.maryana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3749-5214>

Valentina I. Korkina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of biochemistry, Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies, Krasnoobsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9472-5787>,

Mariia A. Makarova — D. Sci. (Med.), senior researcher, Head, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Ekaterina A. Litvinova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Head, Research Center "Biopolymer Technology", Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6398-7154>

Author contribution: *Morozova M.V., Litvinova E.A.* — conducting research, writing an article; *Korkina V.I.* — analysis of the amino acid composition of muscles; *Makarova M.A.* — editing. All authors read and approved the final version prior to publication.

The article was submitted 21.01.2024;
accepted for publication 26.03.2024;
published 29.04.2024



Молекулярно-генетические детерминанты вирулентности *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных и новорождённых Санкт-Петербурга и Ленинградской области в 2010–2023 годах

Шалепо К.В.[✉], Хуснутдинова Т.А., Будиловская О.В., Крысанова А.А., Сапожников К.В., Савичева А.М., Коган И.Ю.

Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Введение. Колонизация репродуктивных органов беременных стрептококками группы В (*S. agalactiae*) может приводить к тяжёлой перинатальной и неонатальной патологии. В современных условиях требуется не только антибактериальная профилактика антенатального инфицирования плода в родах, но и вакцинопрофилактика. Изучение молекулярно-генетических детерминант вирулентности циркулирующих штаммов СГВ в популяции необходимо для понимания эпидемиологии СГВ-инфекций и разработки альтернативных подходов к их профилактике

Цель: определение молекулярно-генетических детерминант вирулентности *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных и новорождённых, и мониторинг типов капсульных полисахаридов и профилей пилей клинических изолятов СГВ.

Материалы и методы. В исследование были включены клинические изоляты СГВ ($n = 420$), выделенные у беременных и новорождённых в 2010–2023 гг. Для выделения *S. agalactiae* использовали бактериологический метод; тип капсульных полисахаридов, пилей, принадлежность штаммов к гипервирулентному сиквенс-типу ST-17 определяли методом полимеразной цепной реакции.

Результаты. В течение 13 лет наблюдения отмечено доминирование Ia, III и V генотипов капсульных полисахаридов СГВ как у беременных, так и у новорождённых. Частота встречаемости Ib генотипа увеличилась с 0,7 до 6,7%, V генотипа — с 12,1 до 24,4%, а распространённость III генотипа значительно снизилась — с 41,1 до 21,1%. У 6 беременных и 2 новорождённых был обнаружен гипервирулентный сиквенс-тип ST-17. Однако признаков неонатальной инфекции у этих детей не было. Более половины всех клинических изолятов *S. agalactiae* имели пили генотипов PI-1 + PI-2a, PI-2a и PI-1 + PI-2b. Распределение типов пилей не изменилось за весь период наблюдения.

Заключение. Мониторинг генотипов капсульных полисахаридов и пилей СГВ необходим для разработки эффективных профилактических вакцин.

Ключевые слова: стрептококки группы В, *Streptococcus agalactiae*, капсульный полисахарид, сиквенс-тип, пили, вирулентность, беременные, новорождённые

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов и их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ АГиР им. Д.О. Отта (протокол № 114 от 14.12.2021).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках фундаментального научного исследования FGWN-2022-0004 «Оптимизация методов предикции, профилактики и лечения «больших акушерских синдромов, а также стратегии родоразрешения у беременных из групп высокого риска, с целью улучшения акушерских и перинатальных исходов».

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

Для цитирования: Шалепо К.В., Хуснутдинова Т.А., Будиловская О.В., Крысанова А.А., Сапожников К.В., Савичева А.М., Коган И.Ю. Молекулярно-генетические детерминанты вирулентности *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных и новорождённых Санкт-Петербурга и Ленинградской области в 2010–2023 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):217–226.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-501>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-501>

Molecular genetic determinants of virulence of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg and the Leningrad region in 2010–2023

Kira V. Shalepo[✉], Tatiana A. Khusnutdinova, Olga V. Budilovskaya, Anna A. Krysanova, Kirill V. Sapozhnikov, Alevtina M. Savicheva, Igor Yu. Kogan

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Colonization of the reproductive organs of pregnant women with group B streptococci (GBS; *Streptococcus agalactiae*) can lead to severe perinatal and neonatal pathology. In modern conditions, aside from the prevention of antenatal infection of the fetus during childbirth using antibacterial drugs, vaccination is also necessary. In this regard, surveillance of GBS genotypes is an important task.

Objective. To determine the molecular genetic determinants of virulence of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women and newborns, and to monitor the distribution of capsular polysaccharides types and pili profiles in GBS clinical isolates.

Materials and methods. The study used clinical isolates of GBS ($n = 420$) isolated from pregnant women and newborns in 2010–2023. The bacteriological method was used for isolation of *S. agalactiae*. PCR method was used to determine the types of capsular polysaccharides, pili, and whether the strains belonged to the hypervirulent sequence type ST-17.

Results. During 13 years of observation, the predominance of Ia, III and V genotypes of GBS capsular polysaccharides was noted both in pregnant women and in newborns. The frequency of occurrence of genotype Ib increased from 0.7 to 6.7%, genotype V from 12.1 to 24.4%, and the prevalence of genotype III decreased significantly from 41.1 to 21.1%. Hypervirulent sequence type ST-17 was detected in 6 pregnant women and 2 newborns. However, there were no signs of neonatal infection in these children. More than half of all clinical isolates of *S. agalactiae* had pili genotypes PI-1 + PI-2a, as well as pili genotypes PI-2a and PI-1 + PI-2b. The distribution of pili types did not change over 13 years of the surveillance period.

Conclusion. Surveillance of the GBS capsular polysaccharides and pili genotypes is necessary for the development of effective preventive vaccines.

Keywords: group B streptococci (GBS), *Streptococcus agalactiae*, capsular polysaccharide, sequence type, pilus, virulence, pregnant women, newborns

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients and their legal representatives. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynaecology and Reproductology (protocol No. 114, December 14, 2021).

Funding source. The work was carried out as part of the fundamental scientific research FGWN-2022-0004: "Optimization of methods for prediction, prevention and treatment of "major obstetric syndromes, as well as delivery strategies in high-risk pregnant women, in order to improve obstetric and perinatal outcomes". The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

For citation: Shalepo K.V., Khusnutdinova T.A., Budilovskaya O.V., Krysanova A.A., Sapozhnikov K.V., Savicheva A.M., Kogan I.Yu. Molecular genetic determinants of virulence of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg and the Leningrad region in 2010–2023. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):217–226.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-501>

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

Введение

Стрептококки группы В (СГВ), единственным представителем которых являются *Streptococcus agalactiae*, — грамположительные кокки, образующие короткие цепочки, факультативные анаэробы, способные проявлять β-гемолитическую активность. Обычно являются комменсальными организмами и колонизируют желудочно-кишечный

тракт и нижний репродуктивный тракт примерно у 20–30% женщин [1]. В России этот показатель достигает 16,3% [2].

При колонизации СГВ обычно симптомы отсутствуют. Однако СГВ у взрослых могут провоцировать пиелонефрит, артрит, развитие абсцессов, мастит, эндокардит, септицемию и др. *S. agalactiae* являются распространённой причиной воспали-

тельных заболеваний урогенитального тракта женщин и основным этиологическим агентом инфекций раннего неонатального периода. Наибольшую актуальность они приобретают в этиологии перинатальных инфекций, т.к. могут вызывать инфекции мочеполовых путей, преждевременные роды, мертворождение, хориоамнионит, послеродовый сепсис и ряд неблагоприятных исходов для матери и ребёнка: неонатальный сепсис, менингит или пневмонию. Чаще всего инфицирование плода происходит внутриутробно, когда СГВ восходящим путем попадают из влагалища в амниотическую жидкость, но возможно инфицирование во время прохождения плода через родовые пути матери (интранатально).

Инфекции новорождённых, вызванные СГВ, клинически подразделяются на ранние, развившиеся в сроки до 6-го дня жизни ребёнка, и поздние, развившиеся через 7–89 дней после рождения [3].

Сложный патогенез заболевания у матери и ребёнка, ассоциированного с *S. agalactiae*, связан с большим арсеналом факторов вирулентности этого микроорганизма, который может широко варьировать от бессимптомного носительства до развития инвазивной инфекции.

В патогенез СГВ-инфекции вносят вклад более 20 различных факторов вирулентности микроорганизма. К ним относятся адгезины, ферменты и другие белки, которые могут широко варьировать в зависимости от штамма микроба. Важную роль в прикреплении микроорганизма к клетке хозяина играют молекулы клеточной адгезии. Специфические адгезины опосредуют колонизацию *S. agalactiae* к различным рецепторам, присутствующим на поверхности эпителия слизистых оболочек, обеспечивая его передачу новорождённым при их прохождении через родовые пути матери. Эти белки необходимы микроорганизму на начальном этапе колонизации и способствуют инвазии в эпителиальные и эндотелиальные клетки хозяина, а также принимают участие в образовании биоплёнок. Пили являются важным фактором вирулентности и патогенности СГВ и представляют собой длинные нитевидные белковые структуры, состоящие из ковалентно связанных белковых субъединиц, прикрепленные к клеточной стенке, выступающие за пределы капсулы, которая покрывает бактериальную поверхность [4].

Многие факторы вирулентности СГВ влияют на способность каждого штамма колонизировать определённый биотоп или вызывать развитие тяжёлого заболевания. Одним из ключевых факторов вирулентности является капсульный полисахарид СГВ (CPS), впервые выявленный доктором Ребеккой Лансфилд в 1930-х гг. На сегодняшний день известно 10 уникальных серотипов CPS (Ia, Ib, II–IX) [1, 5], при этом на 6 из них (Ia, Ib, II–V) во всём мире приходится 98% [1].

Существует несколько подходов для определения серотипов *S. agalactiae*. Тест на преципитацию по Лансфилд (метод латекс-агглютинации) считается стандартным методом определения серотипов СГВ. К молекулярно-биологическим методам, основанным на анализе ДНК, относят генотипирование СГВ на основе ПЦР в реальном времени, мультиплексный ПЦР-анализ для прямой идентификации капсульного типа (от Ia до IX) *S. agalactiae* и полногеномное секвенирование. Серотипирование изолятов СГВ важно для понимания локальной эпидемиологии и мониторинга изменения генотипа CPS.

Помимо различия серотипов, СГВ также можно кластеризовать генетически с помощью мультилокусного типирования последовательностей. Это осуществляется путём секвенирования 7 генов «домашнего хозяйства» для любого штамма СГВ, и комбинация этих 7 геномных локусов создаёт тип последовательности (sequence type — ST) [6]. Среди глобальной и экологически разнообразной выборки штаммов были обнаружены 4 основных типа последовательностей: ST-1, ST-17, ST19 и ST23 [6]. Из них ST-1 и ST-19 были в основном связаны с бессимптомным носительством СГВ, ST-23 был распространён как среди бессимптомных носителей, так и среди случаев инвазивного заболевания, а штаммы ST-17 серотипа III были связаны с неонатальными инвазивными инфекциями [6].

В мире существует несколько подходов к проведению антенатального скрининга на СГВ. Во-первых, это универсальный скрининг на *S. agalactiae* на поздних сроках беременности (35–37 нед) с применением метода культуральной диагностики. Другой подход основан на наличии акушерских факторов риска развития инфекции (роды при сроке беременности < 37 нед, безводный промежуток более 18 ч, температура тела выше 38°C). Универсальный антенатальный скрининг на СГВ применяется в США и Канаде [7]. Скрининг на основе факторов риска, используемый в Швеции и Великобритании, более осторожен, поскольку женщины тестируют только в том случае, если у них проявляются симптомы заболевания, связанные с СГВ, например, преждевременные роды, или если у них в анамнезе были неблагоприятные исходы беременности [5].

В России с 2021 г. действует Приказ МЗ РФ № 1130н от 20.10.2020 «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология"», в соответствии с которым необходим скрининг беременных на наличие СГВ в сроки 35–37 нед беременности. Согласно этому приказу, исследуется отделяемое влагалища или одновременно влагалища и прямой кишки и проводится бактериологическое исследование с целью выделения *S. agalactiae*. При выделении СГВ на-

значаются антибактериальные препараты в родах с целью антибиотикопрофилактики антенатального инфицирования плода.

В настоящее время разработаны меры профилактики ранних СГВ-инфекций, основанные на парентеральном введении антибиотиков во время родов женщинам с высоким риском передачи микроорганизма новорождённому. Если эффективность этого метода не вызывает сомнений, то выбор женщин, которым показана антибиотикопрофилактика, является предметом дискуссий.

Несмотря на то что антибиотикопрофилактика является хорошим методом предотвращения вертикальной передачи инфекции, вызванной *S. agalactiae*, и снижения частоты заболеваемости у новорождённых, существует опасность развития резистентности *S. agalactiae* к антибиотикам.

В настоящее время в качестве профилактики развития инвазивных форм СГВ-инфекции у новорождённых считается вакцинация как беременных женщин, так и женщин, планирующих беременность. Данная стратегия основана на способности материнских IgG проникать через плаценту и обеспечивать иммунную защиту не только от раннего начала заболевания, но также от позднего начала заболевания и послеродовых осложнений, связанных со СГВ. СГВ занимает экологические ниши (например, нижние отделы желудочно-кишечного тракта и слизистая оболочка влагалища), которые относительно инертны с иммунологической точки зрения. Фактически, значительная часть женщин, колонизированных СГВ, имеет низкие концентрации IgG к CPS в сыворотке крови, и эти женщины представляют высокий риск раннего инфицирования новорождённых [6]. Разработка безопасной и эффективной вакцины, которую можно вводить во время беременности или до неё, остаётся основной целью, поскольку современные терапевтические стратегии профилактики на основе антибиотиков не устраняют все случаи инвазивных инфекций, вызванных СГВ.

Разработка вакцин нацелена на детерминанты *S. agalactiae*, колонизирующих вагинальный биотоп и способных к инвазии. Самой перспективной из них был признан CPS, на основе которого учёными из США и Южной Африки в 2013 г. была разработана трёхвалентная вакцина, которая успешно проходит клинические испытания [9].

В 2017 г. были начаты клинические испытания поливалентной вакцины, направленной на серотипы Ia, Ib, II, III и V СГВ. В это же время было отмечено увеличение роста числа инфекций, вызванных серотипом IV СГВ, поэтому этот серотип был добавлен в состав шестивалентной вакцины. Эта вакцина позволила охватить 98% неонатальных инфекций, вызванных СГВ.

Новая шестивалентная конъюгированная СГВ-вакцина (GBS6) направлена на серотипы Ia,

Ib, II, III, IV и V СГВ [10], которые распространены во всём мире. Моновалентные, бивалентные и трёхвалентные вакцины против серотипов Ia, Ib, II, III и V СГВ ранее изучались у небеременных и беременных женщин. Было показано, что эти вакцины безопасны и вызывают поствакцинальное увеличение антител к СГВ у младенцев и вакцинированных лиц. Однако пока не существует лицензированных вакцин против инфекции, вызванной СГВ [10]. Задачу также осложняет доля бескапсульных штаммов СГВ, которая достигает 10% в некоторых популяциях.

Другой перспективной мишенью являются поверхностные белки и белки пилей СГВ.

В 2024 г. был проведён большой систематический обзор всех существующих кандидатов на вакцину против СГВ. Все кандидаты вакцин против СГВ продемонстрировали хорошие данные по иммуногенности и безопасности для небеременных и беременных женщин. Наиболее многообещающими вакцинами-кандидатами является поливалентная вакцина на основе CPS или вакцина на основе поверхностных субъединичных белков широкого спектра действия. В целом обнаружение этих молекулярных факторов вирулентности СГВ определяет несколько перспективных мишеней для разработки профилактических вакцин. Этот систематический обзор также подчёркивает, что всё ещё существуют значительные неопределённости в детерминантах реакции антител, особенно у людей с низким исходным уровнем антител к СГВ [11].

Для снижения перинатальной заболеваемости и смертности следует уделять больше внимания клинической практике, скринингу, повсеместному выявлению и лечению возможного инфицирования матери и ребёнка СГВ, а также профилактике антенатального инфицирования плода и новорождённого. Мониторинг циркулирующих штаммов СГВ в регионе позволит оценить стратегию профилактики инвазивных неонатальных инфекций.

Целью данного исследования явилось определение молекулярно-генетических детерминант вирулентности СГВ, выделенных у беременных и новорождённых, и мониторинг распределения типов CPS и профилей пилей штаммов СГВ в Санкт-Петербурге и Ленинградской области.

Материалы и методы

В исследовании были использованы клинические изоляты СГВ, выделенные у беременных в III триместре гестации и новорождённых в 2010–2023 гг. в НИИ АГиР им. Д.О. Отга. Клиническими материалами у женщин служили средняя порция свободно выпущенной мочи, отделяемое влагалища и/или цервикального канала и слизистой прямой кишки; у новорождённых — отделяемое задней стенки глотки, полости носа, поверхность

наружного слухового прохода, кожа подмышечных впадин, меконий.

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов и их законных представителей, протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИ АГиР им. Д.О. Отта (протокол № 114 от 14.12.2021).

Клинические материалы исследовали бактериологическим методом с использованием селективного питательного бульона (бульон Тодда–Хьюита), содержащего колистин сульфат, налидиксовую и оксолиновую кислоты, которые подавляют сопутствующую микробиоту, и на агаре Мюллера–Хинтона с добавлением 5% дефибринированной крови. Выделенные стрептококки идентифицировали с использованием CAMP-теста и методом белкового профилирования MALDI-TOF («Bruker»). Для дальнейших исследований штаммы хранили при температуре -70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 30% глицерина.

Выделение бактериальной ДНК проводили комплектом реагентов для экстракции ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя.

Серотип и вариант пилей определяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовали набор «Tersus plus PCR kit» («Евроген»). Термоциклирование проводили с помощью амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология»). Для определения типов CPS был использован метод, предложенный К. Яо и соавт. [12].

Тип пилей выявляли по методу, разработанному S. Teatero и соавт. [13]. Метод включает в себя постановку двух ПЦР. Первая реакция — мультиплексная, она содержит смесь 4 пар праймеров к генам локусов PI (Pilus islands) — PI-1, PI-1b, PI-2a, PI-2b, ампликоны которых различаются по размеру. Вторая реакция содержит пару праймеров, соответствующих началу и концу 2 генов, фланкирующих локус-профага PI-1. Если профаг отсутствует, эти праймеры амплифицируют только фланкирующие профаг гены, что соответствует 648 парам нуклеотидов. Эту реакцию используют как контроль для PI-1-отрицательных изолятов.

Для определения гипервирулентного ST-17 использовали метод ПЦР с праймерами к гену *gbs2018-ST-17*. Если штамм СГВ относился к гипервирулентному ST-17, получали ампликон размером 210 п.о.

Для разделения полученных ампликонов применяли электрофорез ДНК в 2% агарозном геле. Для установления молекулярного размера ампликонов использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген»). Результаты визуализировали с помощью гель-документирующей системы «Infinity» («VilberLourmat»).

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение «R v. 4.3.0». Исследование обсервационное, в которое вошли 100% доступных случаев исследования за 2010–2011, 2016–2020 и 2021–2023 гг., поэтому мощность не проверяли. Доли пациентов с тем или иным признаком представлены как в абсолютных значениях (n/N , где n — число пациентов с признаком, N — размер группы), так и в виде относительных единиц (%) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ), рассчитанным по методу Клоппера–Пирсона. Разницу долей оценивали при помощи точного критерия Фишера. В случае множественных сравнений применяли поправку Холма. Критический уровень, после которого отвергалась нулевая гипотеза, принят при $p = 0,05$.

Результаты

Для мониторинга распределения генотипов CPS и профилей пилей у СГВ, выделенных у беременных и новорождённых в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в 2010–2023 г., исследовано 420 клинических изолятов СГВ. Мы разделили эти клинические изоляты на периоды 2010–2011, 2016–2020 и 2021–2023 гг. Периоды наблюдения были выбраны в связи с тем, что в указанные периоды была проведена сравнительная оценка факторов вирулентности СГВ и антибиотикорезистентности за 10 лет. В 2021–2023 гг. в связи с продолжением мониторинга СГВ стали накапливаться новые данные, и этот период также был взят для анализа.

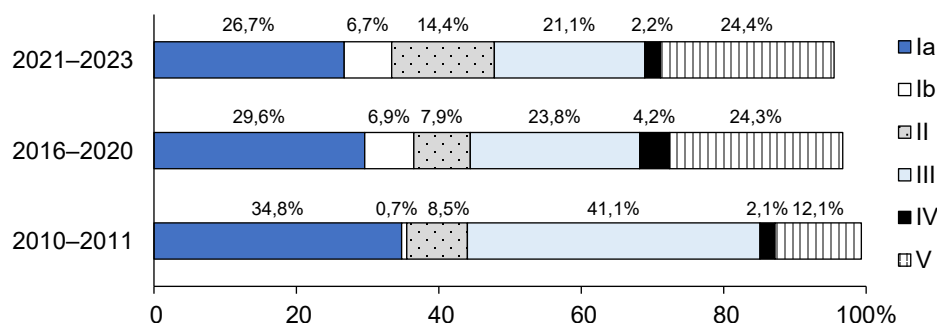
В табл. 1 представлены данные по распределению CPS у клинических изолятов СГВ, выделенных у беременных женщин и новорождённых в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в разные периоды. В регионе во все периоды наблюдения доминировали генотипы Ia, III и V CPS СГВ, а генотипы VI, VII и IX встречались редко. На протяжении всего времени наблюдения отсутствовал генотип VIII. В течение 13 лет наблюдения частота выявления разных генотипов СГВ изменяется. Так, с 2010–2011 по 2021–2023 гг. увеличилась частота встречаемости генотипа Ib (с 0,7 до 6,7%; $p = 0,015$) и генотипа V (с 12,1 до 24,4%; $p = 0,02$), а распространённость генотипа III значительно снизилось (с 41,1 до 21,1%; $p = 0,003$). Следует отметить отрицательную динамику в частоте выявления генотипов Ia, Ib, III, которые включены в трёхвалентную вакцину, с 76,6 до 54,4% (табл. 1). Выявление 6 генотипов (Ia, Ib, II, III, IV, V) сохраняется на уровне более 95,0%. Такое распределение генотипов указывает на то, что шестивалентная вакцина на основе CPS была бы эффективна в нашем регионе. Эти изменения требуют пристального внимания и постоянного мониторинга, особенно при перспективе создания профилактических вакцин.

Таблица 1. Распределение CPS у клинических изолятов *S. agalactiae*, выделенных у беременных и новорождённых вместе в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, *n/N*; % (95% ДИ)**Table 1.** Distribution of capsular polysaccharides in clinical isolates of *S. agalactiae* isolated from pregnant women and newborns together in St. Petersburg and the Leningrad region, *n/N*; % (95% CI)

Генотипы Genotype	2010–2011 (<i>N</i> = 141)	2016–2020 (<i>N</i> = 189)	2021–2023 (<i>N</i> = 90)	Всего Total
Ia	49/141; 34,8% (26,9–43,2%)	56/189; 29,6% (23,2–36,7%)	24/90; 26,7% (17,9–37%)	129/420; 30,7% (26,3–35,4%)
Ib	1/141; 0,7% (0–3,9%)	13/189*; 6,9% (3,7–11,5%)	6/90*; 6,7% (2,5–13,9%)	20/420; 4,8% (2,9–7,3%)
II	12/141; 8,5% (4,5–14,4%)	15/189; 7,9% (4,5–12,8%)	13/90; 14,4% (7,9–23,4%)	40/420; 9,5% (6,9–12,7%)
III	58/141; 41,1% (32,9–49,7%)	45/189**; 23,8% (17,9–30,5%)	19/90**; 21,1% (13,2–31%)	122/420; 29% (24,7–33,6%)
IV	3/141; 2,1% (0,4–6,1%)	8/189; 4,2% (1,8–8,2%)	2/90; 2,2% (0,3–7,8%)	13/420; 3,1% (1,7–5,2%)
V	17/141; 12,1% (7,2–18,6%)	46/189*; 24,3% (18,4–31,1%)	22/90*; 24,4% (16–34,6%)	85/420; 20,2% (16,5–24,4%)
VI	0/141; 0% (0–2,6%)	2/189; 1,1% (0,1–3,8%)	2/90; 2,2% (0,3–7,8%)	4/420; 1% (0,3–2,4%)
VII	1/141; 0,7% (0–3,9%)	2/189; 1,1% (0,1–3,8%)	2/90; 2,2% (0,3–7,8%)	5/420; 1,2% (0,4–2,8%)
VIII	0/141; 0% (0–2,6%)	0/189; 0% (0–1,9%)	0/90; 0% (0–4%)	0/420; 0% (0–0,9%)
IX	0/141; 0% (0–2,6%)	2/189; 1,1% (0,1–3,8%)	0/90; 0% (0–4%)	2/420; 0,5% (0,1–1,7%)
Ia, Ib, III	108/141; 76,6% (68,7–83,3%)	114/189**; 60,3% (53–67,3%)	49/90**; 54,4% (43,6–65%)	271/420; 64,5% (59,7–69,1%)
Ia, Ib, II, III, IV, V	140/141; 99,3% (96,1–100%)	183/189; 96,8% (93,2–98,8%)	86/90; 95,6% (89–98,8%)	409/420; 97,4% (95,4–98,7%)

Примечание. Данные за 2010–2020 гг. получены и опубликованы нами ранее [14, 15]. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$ по сравнению с данными за 2010–2011 гг.

Note. Data for 2010–2020 were obtained and published by us earlier [14, 15]. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ compared to the data for 2010–2011.



Динамика частоты выявления основных CPS у *S. agalactiae*, выделенных у беременных и новорождённых в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в разные периоды.

Dynamics of the frequency of detection of the main capsular polysaccharides in *S. agalactiae* isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg and the Leningrad region during different periods.

Эти данные более наглядно представлены на рисунке, где отражены динамика увеличения частоты обнаружения генотипов Ib, V и уменьшение частоты выявления генотипа III СГВ.

Обнаружение СГВ у беременной перед родами является прогностическим фактором колонизации новорождённых СГВ (при вертикальной передаче возбудителя). Было важно оценить частоту выявления генотипов CPS у матерей и их новорождённых.

В нашем исследовании было выделено 199 пар мать–ребёнок. СГВ был обнаружен у всех матерей, колонизация новорождённых составила 52,76% (45,84–59,58%).

Наиболее часто в паре мать–ребёнок определялись генотипы III (17,0%), Ia (16,1%) и V (10,5%). Генотипы IV, VII и IX встречались в 0,5% случаев. Генотипы VI и VII были редки в нашей популяции и не были выделены в паре мать–ребёнок. Все пред-

Таблица 2. Частота выявления генотипов CPS в паре мать–ребёнок в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в 2010–2023 гг.

Table 2. Frequency of detection of genotypes of capsular polysaccharides in the mother-newborn pairs in St. Petersburg and the Leningrad region in 2010–2023

Генотипы Genotype	Пары мать–ребёнок, N = 105 Mother neonate pairs, N = 105	
	n	% (95% ДИ CI)
Ia	32	16,1 (11,27–21,94)
Ib	3	1,5 (0,31–4,54)
II	13	6,53 (3,76–10,95)
III	34	17,0 (12,46–27,96)
IV	1	0,5 (0,01–3,08)
V	20	10,05 (6,53–15,08)
VI	0	0
VII	1	0,5 (0,01–3,08)
VIII	0	0
IX	1	0,5 (0,01–3,08)

ставленные генотипы, выделенные у матери, совпадали с генотипами, выделенными у новорождённых детей (табл. 2).

Изоляты СГВ, выделенные в 2021–2023 гг., были проанализированы на принадлежность к гипервирулентному ST-17. Из 90 изолятов СГВ, выделенных у беременных и новорождённых, гипервирулентный ST-17 был обнаружен у 6 (6,7%) изолятов СГВ, принадлежащих к III генотипу. У 2 детей, родившихся у этих 6 женщин, также был выделен СГВ с данным сиквенс-типом, но у них признаков СГВ-инфекции не было.

В табл. 3 представлены данные по распределению генотипов пилей у *S. agalactiae*, выделенных у беременных женщин и новорождённых в Санкт-Петербурге в разные периоды наблюдений.

Таблица 3. Распределение генотипов пилей у штаммов *S. agalactiae*, выделенных у беременных и новорождённых в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, n/N; % (95% ДИ)

Table 3. Distribution of pili genotypes in *S. agalactiae* strains isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg and the Leningrad region, n/N; % (95% CI)

Пили Pilus	2010–2011	2016–2020	2021–2023	Всего Total
PI-1 + PI-2a	76/141; 53,9% (45,7–61,9%)	110/189; 58,2% (50,8–65,3%)	44/90; 48,9% (38,2–59,7%)	230/420; 54,8% (49,9–59,6%)
PI-1 + PI-2b	20/141; 14,2% (8,9–21,1%)	19/189; 10,1% (6,2–15,3%)	12/90; 13,3% (7,1–22,1%)	51/420; 12,1% (9,2–15,7%)
PI-1b + PI-2a	1/141; 0,7% (0–3,9%)	4/189; 2,1% (0,6–5,3%)	0/90; 0% (0–4%)	5/420; 1,2% (0,4–2,8%)
PI-1b + PI-2b	0/141; 0% (0–2,6%)	3/189; 1,6% (0,3–4,6%)	0/90; 0% (0–4%)	3/420; 0,7% (0,1–2,1%)
PI-2a	43/141; 30,5% (23–38,8%)	47/189; 24,9% (18,9–31,7%)	31/90; 34,4% (24,7–45,2%)	90/420; 21,4% (17,6–25,7%)
PI-2b	1/141; 0,7% (0–3,9%)	6/189; 3,2% (1,2–6,8%)	3/90; 3,3% (0,7–9,4%)	10/420; 2,4% (1,1–4,3%)

Более половины всех распространённых в нашем регионе клинических изолятов *S. agalactiae* имели пилы генотипа PI-1 + PI-2a, что составило 53,9% в 2010–2011 гг., 58,2% в 2016–2020 гг. и 48,9% в 2021–2023 гг., различие статистически незначимо. Следующими по распространённости были генотипы пилей PI-2a (30,5% в 2010–2011 гг., 24,9% в 2016–2020 гг. и 21,4% в 2021–2023 гг. ($p > 0,05$)) и PI-1 + PI-2b (частота их выявления составила 12,1% за весь период наблюдения). Генотип PI-2b СГВ был одним из самых редких, что также согласуется с данными исследований, проведённых в Европе. Генотип СГВ, включающий недавно описанный локус PI-1b, как и ожидалось, встречался крайне редко.

Обсуждение

В этом исследовании мы проследили изменения генотипов CPS *S. agalactiae* среди беременных женщин и новорождённых детей в Санкт-Петербурге и Ленинградской области. В нашем регионе генотип СГВ Ia доминировал в 2010–2011 гг. и выявлялся в 34,8% случаев, в 2016–2020 гг. он встречался в 29,6% и в настоящее время — в 26,7%. В течение всего периода наблюдения треть (30,7%) всех клинических изолятов СГВ относилась к генотипу Ia. На втором месте по распространённости был генотип III. Однако в течение 13 лет произошли изменения в частоте выявления генотипа III СГВ, а именно значительное снижение с 41,1% в 2010–2011 гг. до 21,1% в 2021–2023 гг. ($p = 0,003$). Таким образом, доминирующими за весь период наблюдения генотипами остаются Ia, III и V. Эти данные совпадают с данными, полученными в других странах. Генотипы III, Ia и V были наиболее распространёнными генотипами СГВ в нескольких регионах (Европа и Северная Америка, Восточная Азия, Южная, Восточная/Центральная Африка и Австралия/Новая Зеландия) [17]. Наиболее распространённым генотипом СГВ, колонизирующим беременных во всём мире, был ге-

нотип III, встречающийся с частотой 25% (95% ДИ 23–27%), а также генотип Ia, выявляющийся у 19% (95% ДИ 17–21%) женщин [16].

В Европе и Северной Америке генотип IV встречался с частотой 4%, в Южной Африке — 3%. Генотипы VI–IX редко выявлялись в Европе (1%) [16]. В Санкт-Петербурге и Ленинградской области генотипы VI, VII и IX встречались редко (1; 1,2; 0,5% соответственно). На протяжении всего времени наблюдения генотип VIII не выявлялся ни разу.

Нужно отметить, что, по результатам нашего исследования, частота встречаемости Ib генотипа, который является одним из компонентов вакцины, увеличилась с 0,7% в 2010–2011 до 6,7% в 2021–2023 гг. ($p = 0,015$).

Во всем мире Ia, Ib, II–V генотипы охватывают более 99% всех случаев СГВ-инфекций, включая раннюю и позднюю неонатальную инфекцию [17]. В нашем регионе охват этих генотипов составляет (от 99 до 95,5% в разные периоды наблюдения). Эти изменения требуют пристального наблюдения за представленными генотипами при создании вакцин.

Уровень вертикальной передачи СГВ в паре мать–ребёнок в нашем исследовании составил 52,76%, и было показано совпадение молекулярно-генетических характеристик среди СГВ-положительных пар мать–ребёнок. В паре мать–ребёнок доминировали те же генотипы CPS. По данным разных авторов, частота вертикальной передачи от колонизированных СГВ матерей варьирует от 54,2% в Турции до 14,1% в Китае [18].

По данным литературы, гипервирулентные штаммы СГВ ST-17 связаны с риском развития неонатальных инвазивных инфекций. Данный сиквенс-тип СГВ был обнаружен нами у 6 женщин и 2 новорождённых. При обнаружении гипервирулентных штаммов ST-17 *S. agalactiae* у беременных женщин необходимо наблюдение за их новорождёнными детьми, т.к. они попадают в группу риска развития ранней и поздней инфекции и у них увеличивается риск развития менингита [19].

Основным ограничением вакцин на основе CPS является необходимость обеспечивать защиту от нескольких серотипов, поэтому стратегии мультивалентных вакцин представляют большой интерес. Трёхвалентная вакцина Novartis/GSK (Novartis/GSK GBS3), содержащая конъюгат CPS Ia/Ib/III, считается безопасной для беременных женщин, вызывает выработку высоких титров материнских антител, и антитела передаются трансплацентарно плоду [20]. К сожалению, трёхвалентная вакцина до сих пор не включает все клинически значимые генотипы СГВ и может привести к селекции невакцированных штаммов путём замены капсулы — явление, которое наблюдалось во многих популяциях высокого риска и среди штаммов ST-17 [19].

По нашим данным, эффективность трёхвалентной вакцины у беременных в 2010–2011 гг. составила бы 76,6%, в 2016–2020 гг. — 60,3%, в настоящее время её эффективность составляет лишь 54,4%. Задачу также осложняет доля бескапсульных штаммов СГВ, которая достигает 10% в некоторых популяциях. Исследование новой шестивалентной (серотипы Ia, Ib, II, III, IV и V) конъюгированной СГВ-вакцины (GBS6) [10], на долю которой приходится примерно 98% генотипов СГВ, которые распространены во всём мире, показало, что именно эти генотипы наиболее часто выявляются и в нашем регионе. Моновалентные, бивалентные и трёхвалентные вакцины против генотипов Ia, Ib, II, III и V СГВ ранее изучались у небеременных и беременных женщин. Было показано, что эти вакцины безопасны и вызывают поствакцинальное увеличение антител к СГВ у новорождённых и вакцинированных женщин. Не существует лицензированных вакцин против заболеваний, вызванных СГВ [10]. Однако наличие новых генотипов и нетипируемых изолятов СГВ, а также возможность смены генотипов подтверждают необходимость постоянного наблюдения за генотипами, чтобы внести вклад в разработку универсальной вакцины [9, 11].

Важным фактором повышения вирулентности СГВ является не только капсула, но и пили. Большинство СГВ содержат PI-1 + PI-2a, и наличие этих пилей стабилизирует колонизацию [21]. Комбинация PI-1 и PI-2a преобладала среди изолятов СГВ, колонизирующих 38% беременных, PI-2a — 32%. Наибольшую долю генотипов с генами белков островков пилей составляли генотип Ia — 69% (только PI-2a) и генотип III — 85% штаммов (PI-1 и PI-2b) [22].

I. Margarit и соавт. в обширном исследовании по изучению пилей СГВ на большой коллекции клинических изолятов продемонстрировали, что все изоляты СГВ содержат по крайней мере один или комбинацию двух PI, а вакцина на основе пилей обеспечит широкую защиту [23]. Более половины всех распространённых в нашем регионе клинических изолятов *S. agalactiae* имели пили генотипа PI-1 + PI-2a. Следующими по распространённости были генотипы пилей PI-2a (от 24,9 до 34,4%) и PI-1 + PI-2b (12,1%). Как показывают наши исследования, распределение генотипов пилей не изменилось в наблюдаемый период. Полученные нами данные совпадают с данными, полученными в США и странах Европы [7]. Важно отметить, что вакцина, основанная на компонентах пилей, была бы эффективна в течение всего периода.

Заключение

Несмотря на плодотворные исследования последних лет, наше понимание двойной роли СГВ как комменсала и патогена пронизано множеством пробелов в знаниях. Более фундаментальные ис-

следования, раскрывающие молекулярную основу факторов вирулентности и реакции хозяина на СГВ, необходимы для разработки новых методов профилактики, которые могут быть эффективными в предотвращении СГВ инфекций у новорождённых.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Russell N.J., Seale A.C., O'Driscoll M., et al. Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S100–11. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix658>
2. Хван В.О., Шипицына Е.В., Зацiorsкая С.Л. и др. Частота и факторы риска колонизации беременных женщин стрептококками группы В. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2017;66(6):44–58. Khvan V.O., Shipitsyna E.V., Zatsiorskaya S.L., et al. Frequency and risk factors of colonization of pregnant women with group B streptococci. *Journal of Obstetrics and Woman Disease.* 2017;66(6):44–58. DOI: <https://doi.org/10.17816/JOWD66644-58> EDN: <https://elibrary.ru/knjtfe>
3. Verani J.R., McGee L., Schrag S.J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease — revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 2010;59(RR-10):1–36.
4. Rosini R., Margarit I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2015;5:6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00006>
5. Le Doare K., O'Driscoll M., Turner K., et al. Intrapartum antibiotic chemoprophylaxis policies for the prevention of group B streptococcal disease worldwide: systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S143–51. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix654>
6. Jones N., Bohnsack J.F., Takahashi S., et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(6):2530–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2530-2536.2003>
7. Russell N.J., Seale A.C., O'Sullivan C., et al. Risk of early-onset neonatal group B streptococcal disease with maternal colonization worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(Suppl. 2):S152–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix655>
8. Margarit I., Rinaudo C.D., Galeotti C.L., et al. Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm. *J. Infect. Dis.* 2009;199(1):108–15. DOI: <https://doi.org/10.1086/595564>
9. Madhi S.A., Dangor Z., Heath P.T., et al. Considerations for a phase-III trial to evaluate a group B *Streptococcus polysaccharide*-protein conjugate vaccine in pregnant women for the prevention of early- and late-onset invasive disease in young-infants. *Vaccine.* 2013;31(Suppl. 4):D52–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.029>
10. Absalon J., Segall N., Block S.L., et al. Safety and immunogenicity of a novel hexavalent group B streptococcus conjugate vaccine in healthy, non-pregnant adults: a phase 1/2, randomised, placebo-controlled, observer-blinded, dose-escalation trial. *Lancet Infect. Dis.* 2021;21(2):263–74. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30478-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30478-3)
11. Bjerkhaug A.U., Ramalingam S., Mboizi R., et al. The immunogenicity and safety of Group B *Streptococcal* maternal vaccines: a systematic review. *Vaccine.* 2024;42(2):84–98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.11.056>
12. Yao K., Poulsen K., Maione D., et al. Capsular gene typing of *Streptococcus agalactiae* compared to serotyping by latex agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(2):503–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.02417-12>
13. Teatero S., Neemuchwala A., Yang K., et al. Genetic evidence for a novel variant of the pilus Island 1 backbone protein in group B *Streptococcus*. *J. Med. Microbiol.* 2017;66(10):1409–15. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000588>
14. Колоусова К.А., Шипицына Е.В., Шалепо К.В., Савичева А.М. Факторы вирулентности и патогенности штаммов *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных и новорождённых. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2021;70(5):15–22. Kolousova K.A., Shipitsyna E.V., Shalepo K.V., Savicheva A.M. Virulence and pathogenicity factors of *S. agalactiae* strains isolated from pregnant women and newborns. *Journal of Obstetrics and Woman Disease.* 2021;70(5):15–22. DOI: <https://doi.org/10.17816/JOWD75671> EDN: <https://elibrary.ru/oateln>
15. Shipitsyna E., Shalepo K., Zatsiorskaya S., Krysanova A., et al. Significant shifts in the distribution of vaccine capsular polysaccharide types and rates of antimicrobial resistance of perinatal group B streptococci within the last decade in St. Petersburg, Russia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2020;39(8):1487–93. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03864-1> EDN: <https://elibrary.ru/xrupas>
16. Bianchi-Jassir F., Paul P., To K.N., et al. Systematic review of Group B *Streptococcal* capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates. *Vaccine.* 2020;38(43):6682–94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.052>
17. Nanduri S.A., Petit S., Smelser C., et al. Epidemiology of invasive early-onset and late-onset group B *Streptococcal* disease in the United States, 2006 to 2015: multistate Laboratory and Population-Based Surveillance. *JAMA Pediatr.* 2019;173(3):224–33. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.4826>
18. Li S., Wen G., Cao X., et al. Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* in a mother-baby prospective cohort study: Implication for vaccine development and insights into vertical transmission. *Vaccine.* 2018;36(15):1941–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.109>
19. Brokaw A., Furuta A., Dacanay M., et al. Waldorf bacterial and host determinants of group B streptococcal vaginal colonization and ascending infection in pregnancy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;11:720789. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.720789>
20. Swamy G.K., Metz T.D., Edwards K.M., et al. Safety and immunogenicity of an investigational maternal trivalent group B streptococcus vaccine in pregnant women and their infants: results from a randomized placebo-controlled phase II trial. *Vaccine.* 2020;38(44):6930–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.056>
21. Liu Y., Liu J. Group B streptococcus: virulence factors and pathogenic mechanism. *Microorganisms.* 2022;10(12):2483. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122483>
22. Rinaudo C.D., Rosini R., Galeotti C.L., et al. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PLoS One.* 2010;5(2):e9216. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009216>
23. Margarit I., Rinaudo C.D., Galeotti C.L., et al. Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm. *J. Infect. Dis.* 2009;199(1):108–15. DOI: <https://doi.org/10.1086/595564>

Информация об авторах

Шалепо Кира Валентиновна[✉] — к.б.н., с.н.с. отдела медицинской микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия, 2474151@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3002-3874>

Хуснутдинова Татьяна Алексеевна — к.м.н., с.н.с. отдела медицинской микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2742-2655>

Будиловская Ольга Викторовна — к.м.н., с.н.с. отдела медицинской микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7673-6274>

Крысанова Анна Александровна — к.м.н., с.н.с. отдела медицинской микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4798-1881>

Сапожников Кирилл Викторович — к.м.н., специалист отдела репродуктологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2476-7666>

Савичева Алеветина Михайловна — д.м.н., профессор, зав. отделом медицинской микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3870-5930>

Коган Игорь Юрьевич — д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН, директор НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7351-6900>

Участие авторов: Шалепо К.В. — методология и дизайн исследования, написание и редактирование рукописи; Хуснутдинова Т.А. — геномные исследования; участие в подготовке рукописи и редактирование рукописи; Сапожников К.В. — статистический анализ; Будиловская О.В., Крысанова А.А. — участие в подготовке рукописи и её редактирование; Савичева А.М. — концептуализация и координация исследования, редактирование рукописи; Коган И.Ю. — концептуализация исследования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 15.02.2024;
принята к публикации 13.04.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Kira V. Shalepo[✉] — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of medical microbiology, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, 2474151@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3002-3874>

Tatiana A. Khusnutdinova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of medical microbiology, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2742-2655>

Olga V. Budilovskaya — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of medical microbiology, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7673-6274>

Anna A. Krysanova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of medical microbiology, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4798-1881>

Kirill V. Sapozhnikov — Cand. Sci. (Med.), specialist, Department of reproductology, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2476-7666>

Alevtina M. Savicheva — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of medical microbiology, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3870-5930>

Igor Yu. Kogan — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Corresponding Member, Director, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7351-6900>

Author contribution: Shalepo K.V. — research methodology and design, writing and editing the manuscript; Khusnutdinova T.A. — genomic research; participation in the preparation of the manuscript and editing the manuscript; Sapozhnikov K.V. — statistical analysis; Budilovskaya O.V., Krysanova A.A. — participation in the preparation of the manuscript and editing the manuscript; Savicheva A.M. — conceptualization and coordination of the study, editing the manuscript; Kogan I.Yu. — conceptualization of the study. 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 15.02.2024;
accepted for publication 13.04.2024;
published 29.04.2024



Генотипирование боррелий, риккетсий и анаплазм в клещах *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus* в Калининградской области

Карташов М.Ю.^{1,2}, Волчев Е.Г.³, Кривошеина Е.И.¹, Свирин К.А.¹,
Терновой В.А.¹, Локтев В.Б.^{1,2,4}✉

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия;

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия;

⁴Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Аннотация

Актуальность. Возбудители клещевых инфекций бактериальной и протозойной природы представляют существенную проблему для общественного здравоохранения.

Цель исследования состояла в детекции и генотипировании боррелий, риккетсий и анаплазм в клещах *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранных на территории Калининградской области в 2021–2022 гг.

Материалы и методы. В исследование были включены 1665 клещей: *I. ricinus* ($n = 862$) и *D. reticulatus* ($n = 803$), собранных в 33 биотопах Калининградской области. Детекцию генетического материала клещевых патогенов проводили в индивидуальных клещах методом ПЦР с последующим секвенированием и филогенетическим анализом специфических последовательностей ДНК.

Результаты. Уровень инфицированности клещей *I. ricinus* боррелиями составил 15,5%, причём генотипирование по последовательности гена *p66* показало наличие ДНК боррелий четырех видов: *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* и *B. lusitaniae*. В клещах *D. reticulatus* ДНК боррелий не выявлено. Генетический материал *Rickettsia* spp. был обнаружен в обоих видах клещей, причём уровень инфицированности клещей *I. ricinus* составил 2,6%, а *D. reticulatus* — 21,2%. В клещах *I. ricinus* обнаружены риккетсии *R. helvetica*, а в луговых клещах — *R. raoultii* при проведении их генотипирования по гену *gltA*. ДНК *Anaplasma phagocytophilum* были обнаружены как в клещах *I. ricinus*, так и в клещах *D. reticulatus*. Выявлены также случаи коинфицирования индивидуального клеща несколькими клещевыми патогенами.

Заключение. В клещах *I. ricinus* и *D. reticulatus*, собранных на территории Калининградской области, обнаружены 6 видов возбудителей клещевых инфекций бактериальной и протозойной природы, причём *R. helvetica*, *R. raoultii* и *A. phagocytophilum* были выявлены впервые.

Ключевые слова: иксодовые клещи, клещевые инфекции, боррелии, риккетсии, анаплазмы, генотипирование, филогенетический анализ, Калининградская область, Россия

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГЗ-7/21).

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

Для цитирования: Карташов М.Ю., Волчев Е.Г., Кривошеина Е.И., Свирин К.А., Терновой В.А., Локтев В.Б. Генотипирование боррелий, риккетсий и анаплазм в клещах *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus* в Калининградской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):227–236.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-503>

EDN: <https://www.elibrary.ru/pebbmх>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-503>

Genotyping of *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the Kaliningrad region

Mikhail Yu. Kartashov^{1,2}, Evgenii G. Volchev³, Ekaterina I. Krivosheina¹, Kirill A. Svirin¹,
Vladimir A. Ternovoi¹, Valery B. Loktev^{1,2,4}✉

¹State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Novosibirsk Region, Koltsovo, Russia;

²Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

³Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

⁴Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract

Background. Tick-borne bacterial and protozoal pathogens pose a significant public health problem. The aim of this study was to detect and genotype *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected in the Kaliningrad region in 2021–2022.

Materials and methods. The study included 862 *I. ricinus* and 803 *D. reticulatus* ticks (1665 in total) collected in 33 biotopes of the Kaliningrad region. Detection of the DNA of tick-borne pathogens was carried out in individual ticks by PCR using a set of specific primers, followed by sequencing and phylogenetic analysis.

Results. The level of infection of *I. ricinus* ticks with *Borrelia* was 15.5%, and genotyping by the *p66* gene sequence showed the presence of genetic material from four species: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, and *B. lusitanae*. In *D. reticulatus* ticks, no *Borrelia* genetic material was detected. The *Rickettsia* DNA has been found in both tick species. Moreover, the infection rate of *I. ricinus* ticks was 2.6%, and *D. reticulatus* — 21.2%. *R. helvetica* were found in *I. ricinus* ticks, and *R. raoultii* in meadow ticks when genotyping by *gltA* gene. Genetic markers of *Anaplasma phagocytophilum* have been found in *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks. Cases of co-infection of an individual tick have also been identified.

Conclusion. Six different species of tick-borne pathogens were found in the *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks collected in the Kaliningrad region and *R. helvetica*, *R. raoultii* and *A. phagocytophilum* were identified for the first time.

Keywords: *ixodes ticks*, *tick-borne infections*, *Borrelia*, *Rickettsiae*, *Anaplasma*, *genotyping*, *phylogenetic analysis*, *Kaliningrad region*, *Russia*

Funding source. The study was carried out within the framework of the state assignment of the State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of Rosпотребнадзор (GZ-7/21).

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

For citation: Kartashov M.Yu., Volchev E.G., Krivosheina E.I., Svirin K.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Genotyping of *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the Kaliningrad region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):227–236.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-503>

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

Введение

Клещи могут быть заражены патогенами вирусной, бактериальной и протозойной природы [1–3]. Помимо достаточно хорошо изученных патогенов, к которым можно отнести вирус клещевого энцефалита и возбудителей иксодового боррелиоза, в клещах могут присутствовать другие микроорганизмы, вызывающие заболевания человека, в том числе и в европейских странах [2, 4–6]. Инфекции, переносимые клещами, являются распространённой группой зооантропонозных заболеваний в России [7, 8]. Структура и характеристика клещевых инфекций, включая генотипирование их возбудителей, на территории европейской части России изучены недостаточно [9]. В последние годы случаи клещевых инфекций человека ассоциируются с клещами *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), *I. pavlovskyi* (Pomerantzev, 1946), *Dermacentor reticulatus* (Fabric, 1794), *D. marginatus* (Sulzer, 1776), *D. nuttali* (Olenov, 1928) в сибирских и дальневосточных регионах России [8, 10]. В европейской части России широко распространены клещи *I. ricinus* (Linnaeus, 1758), которые доминируют в западных регионах страны. Интересно, что появление клещей *D. reticulatus* отмечается в городских

и пригородных биотопах [8, 11]. Так, в Томске их численность возросла более чем в 200 раз для городских биотопов, а инфицированность клещей *D. reticulatus* составила приблизительно 44–48% для *Rickettsia* spp., 0,7–0,9% для вируса клещевого энцефалита и 0,6% для *Anaplasma phagocytophilum*.

Ранее в *I. ricinus* в Ленинградской и Калининградской областях методом ПЦР были предположительно обнаружены 4 вида боррелий при уровне инфицированности 11,5% [12]. Несколько позднее в парковых зонах Санкт-Петербурга на побережье Балтийского моря были обнаружены таёжные клещи (*I. persulcatus*) с уровнем инфицированности 9,3% боррелиями, генотипированными как *B. afzelii* и *B. garinii* [13]. В Финляндии уровень инфицированности *I. ricinus* и *I. persulcatus* различными клещевыми патогенами достигал 30% при значительном доминировании *Borrelia burgdorferi sensu lato* [14]. При этом клещи *I. ricinus* были существенно чаще инфицированы и коинфицированы различными бактериальными и протозойными патогенами.

В Калининградской области в 2022 г. из-за укусов клещей за медицинской помощью обратились

Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генов боррелий, риккетсий и анаплазм из иксодовых клещей

Primers using for isolation gene fragments of *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* from ixodes ticks

Праймер Primer	Структура праймера (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Температура Temperature, °C	Размер, п.н. Size, bp	Источник Reference
Borr2rF	CGAATTAGGCAAAGACGATCC	56	548	[8]
Borr2rR	TTTCATAAGCTCCTGATAAGCCA			
CS409d	CSTATGGCTATTATGCTTGC	56	769	[16]
RP1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA			
MSP2-3f	CCAGCGTTTACGAAGATAAGAG	55	334	[17]
MSP2-3r	GCCCAGTAACAACATCATAAGC			

5379 человек¹. Ежегодно диагностируются только случаи вирусного клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза у пациентов, которые традиционно ассоциируются с клещами *I. ricinus*: в 2022 г. зарегистрировано 3 случая клещевого энцефалита и 49 случаев клещевого боррелиоза. Циркуляция других возбудителей клещевых инфекций и их видовая принадлежность не описаны.

Целью данного исследования являлось обнаружение, изучение видовой принадлежности и генотипирование боррелий, риккетсий и анаплазм, выявляемых в иксодовых клещах, собранных в различных биотопах Калининградской области.

Материалы и методы

Сбор клещей производили с растительности методом «на флаг» в различных биотопах Калининградской области в 2021–2022 гг. Географические координаты биотопов и количество собранных в биотопах клещей представлены в Приложении на сайте журнала. Видовая идентификация клещей осуществлялась морфологическим методом [15].

Выделение нуклеиновых кислот

Клещи были дважды обработаны 70% этанолом для инактивации инфекционных агентов и промыты фосфатно-солевым буфером. Гомогенизацию полученных образцов осуществляли с использованием лабораторного гомогенизатора «TissueLyserLT» («Qiagen») в 300 мкл стерильного физиологического раствора. Выделение проводили из 100 мкл гомогената с использованием набора реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» («НекстБио») согласно инструкции производителя.

Проведение ПЦР

Скрининг полученных образцов на наличие генетических маркеров изучаемых патогенов

осуществляли с помощью ПЦР, используя специфические праймеры (таблица), на термоциклере «Т-1000» («Bio-Rad») в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 10 мМ Трис-НСl (рН 9,0), 50 мМ КСl, 0,1% тритон X-100, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTP, по 0,25 мМ каждого праймера, 1,5 ед. активности HS-Taq-полимеразы («Евроген») и 1–100 нг ДНК-матрицы. При постановке ПЦР использовали следующие температурные режимы: предварительная активация полимеразы — 95°C в течение 5 мин; 38 циклов: 95°C — 20 с, T_{отжига} — 20 с, 72°C — 1 мин; финальная элонгация при 72°C — 4 мин.

Детекцию полученных ампликонов проводили методом гель-электрофореза в 2% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, содержащем 0,1% бромида этидия. Продукты амплификации из агарозного геля очищали с использованием набора на основе микроколонок («Биосилика»).

Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей

Секвенирование по Сэнгеру проводили с использованием набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems»). Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора «3130xl Genetic Analyzer» («Applied Biosystems»). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы «UniproUGENE v. 1.46». Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с ранее опубликованными последовательностями в GenBank при помощи поискового приложения BLAST. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE в программе «MEGA X». Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили методом максимального правдоподобия с использованием модели эволюции Tamura-Nei с целью анализа генетических взаимоотношений/кластеризации нуклеотидных последовательностей. Показатели ста-

¹ Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Калининградской области в 2022 году». Калининград; 2023. 238 с. URL: https://39.rosпотребнадzor.ru/sites/default/files/doklad_o_goskontrole_za_2022_kaliningradskaya.pdf

тистической надёжности узлов филогенетического дерева рассчитаны с помощью бутстреп-анализа с использованием 1000 случайных реплик.

Депонирование нуклеотидных последовательностей

В базу данных GenBank были депонированы нуклеотидные последовательности: фрагменты гена *msp2* *A. phagocytophilum* (OR488786–OR488799); гена *p66* боррелий: *B. afzelii* (OR488840–OR488890), *B. garinii* (OR488891–OR488929), *B. valaisiana* (OR488930–OR488948), *B. lusitaniae* (OR488949–OR488967); фрагменты гена *gltA* риккетсий: *R. helvetica* (OR496610–OR496611) и *R. conorii* subsp. *raoultii*, далее, как базисим *R. raoultii* (OR496612–OR496613). Исследования проводили с соблюдением правил биобезопасности, регламентированных в МУ 1.3.2569–09, СП 1.3.3118–13, СП 3.1.3310–15.

Результаты

Проведён сбор и анализ 1665 индивидуальных образцов нимф и имаго иксодовых клещей видов *I. ricinus* ($n = 862$) и *D. reticulatus* ($n = 803$), собранных на территории 33 городских, пригородных и характерных природных биотопов Калининградской области (рис. 1). Исследованные биотопы подразделялись по видам клещей, собранных в них, следующим образом: 11 биотопов, в которых были отловлены только клещи *I. ricinus*, 9 биотопов — клещи *D. reticulatus* и 13 биотопов с 2 видами клещей. Совершенно необычно, что фактически половина всех собранных клещей была отнесена к луговому клещу, который был обнаружен в 2/3 исследованных биотопов и абсолютно доминировал в 9 из них.

Уровень инфицированности *I. ricinus* боррелиями составил 15,5% (128/862; 95% ДИ 13,2–18,1%). При определении нуклеотидной последовательности фрагмента гена *p66* длиной около 560 п.н. среди

128 образцов были выявлены боррелии четырех видов из комплекса *B. burgdorferi* s.l.: у 51 клеща выявлена ДНК *B. afzelii* (39,9%; 95% ДИ 31,8–48,5%), у 39 — *B. garinii* (30,5%; 95% ДИ 23,2–38,5%), у 19 — *B. valaisiana* (14,8%; 95% ДИ 9,7–22,0%), у 19 — *B. lusitaniae* (14,8%; 95% ДИ 9,7–22,0%). Среди изучаемых образцов клещей вида *D. reticulatus* генетического материала боррелий не выявлено. Филогенетический анализ показал, что боррелии, выявленные в клещах *I. ricinus* на территории Калининградской области, кластеризуются с прототипными изолятами, выделенными прежде всего в европейских странах (рис. 2). Анализ последовательности секвенированного фрагмента гена *p66* *B. afzelii* выявил 6 аллелей этого гена, для изолятов *B. garinii* обнаружено 8 аллельных вариантов, отличающихся друг от друга по 1–14 нуклеотидным заменам, а изоляты *B. valaisiana* и *B. lusitaniae* имели 2 и 4 замены.

Уровень инфицированности риккетсиями клещей составил 11,5% (191/1665; 95% ДИ 10,2–13,1%). Среди клещей вида *I. ricinus* ДНК риккетсий выявлена в 22 образцах, уровень инфицированности — 2,6% (22/862; 95% ДИ 1,7–3,8%). Все выявленные изоляты риккетсий из клещей *I. ricinus* по фрагменту гена цитратсинтазы (*gltA*) были отнесены к *R. helvetica*. При анализе нуклеотидных последовательностей гена *gltA* идентифицированы два основных геноварианта *R. helvetica*, циркулирующие в Калининградской области. Они отличаются друг от друга 2 синонимичными нуклеотидными заменами (уровень гомологии между геновариантами составляет 99,8%). Один из геновариантов соответствует описанному ранее вариантам *R. helvetica*, обнаруженным в Республике Коми и Омской области [9, 18], другой геновариант отличается от известных последовательностей.

В 21,1% клещей *D. reticulatus* обнаружена ДНК риккетсий (169/803; 95% ДИ 18,4–24,0%), которая была генотипирована как *R. raoultii*. Филогенетический анализ *R. raoultii* показал существование двух вариантов, отличающихся одной синонимичной заменой (рис. 3). В целом эти геноварианты соответствуют широкому кругу изолятов *R. raoultii*, циркулирующих в Европе, России и Китае [19, 20].

Методом ПЦР ДНК *A. phagocytophilum* была обнаружена в 12 исследованных образцах клещей вида *I. ricinus* (1,4%; 95% ДИ 0,8–2,5%) и в 2 образцах клещей вида *D. reticulatus* (0,2%; 95% ДИ 0,1–0,9%). У выявленных изолятов *A. phagocytophilum* проведено определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *msp2* длиной примерно 340 п.н. с последующим филогенетическим анализом (рис. 4). На территории Калининградской области обнаружены 3 геноварианта *A. phagocytophilum* с уровнем гомологии порядка 98,6%, тождественные либо наиболее близкие изолятам *A. phagocytophilum*, циркулирующим в Норвегии и Польше.

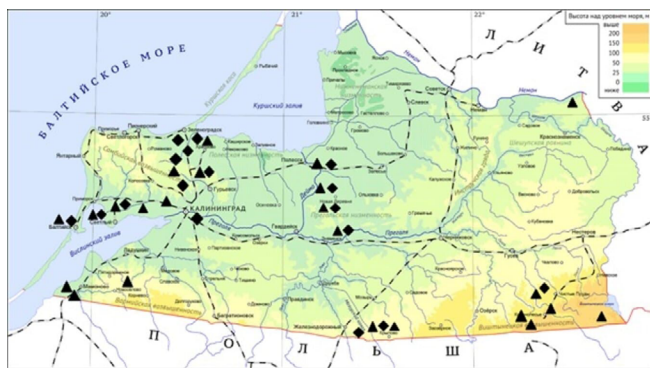


Рис. 1. Места расположения биотопов в Калининградской области, в которых проводился сбор иксодовых клещей в 2021–2022 гг.

Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 1. Locations of biotopes in the Kaliningrad region, where ixodid ticks were collected in 2021–2022.

For a color version of the figure, see the journal's website.

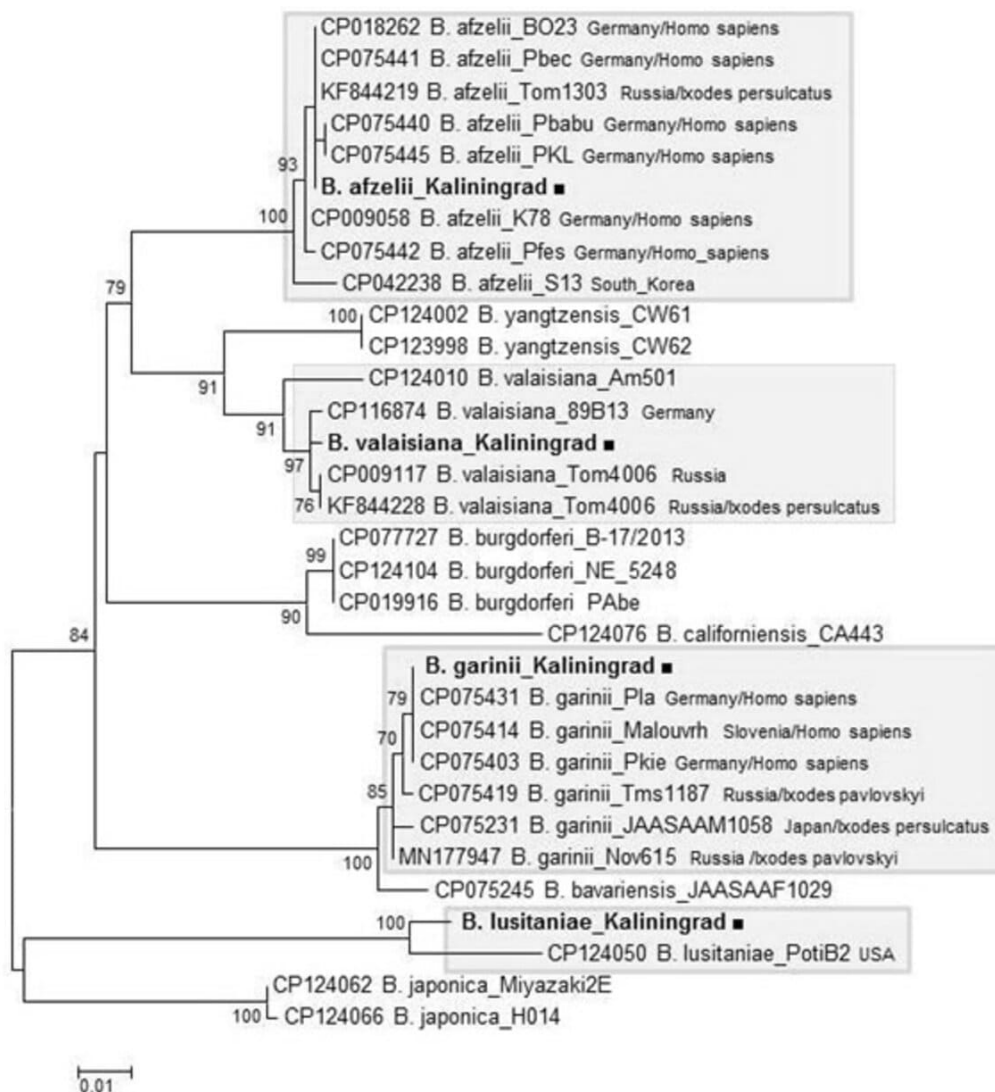


Рис. 2. Дендрограмма, построенная по нуклеотидной последовательности фрагмента гена *p66* для выявленных изолятов боррелий.

Последовательности, отмеченные чёрными квадратами, получены из клеща *I. ricinus*.

Fig. 2. Dendrogram of nucleotide sequences of the *p66* gene fragment for detected borrelia isolates.

Black squares — sequences derived from *I. ricinus* tick.

В 2 пробах клещей содержался одновременно генетический материал *B. afzelii* и *R. helvetica*, в 1 пробе клещей — ДНК *B. valaisiana* и *A. phagocytophilum*.

Обсуждение

Результаты регулярных многолетних полевых наблюдений показывают, что основные рекреационные ландшафты Калининградской области, включая ландшафты побережья Балтийского моря, имеют сформированные популяции иксодовых клещей. При этом активность иксодид в зонах с выраженной антропогенной нагрузкой существенно выше, чем в аналогичных ландшафтах с незначительной антропогенной нагрузкой. Так, в последние годы за медицинской помощью по поводу укусов клещей обращаются 4194–7300 человек. Ежегодно

диагностируется 2–16 случаев вирусного клещевого энцефалита и 35–132 случаев иксодового клещевого боррелиоза. Это многократно повышает риски контакта человека с иксодовыми клещами, что может привести к заражению человека возбудителями различных клещевых инфекций.

Клещевые боррелиозы занимают важное место в структуре инфекционной патологии в Калининградской области. В клещах Калининградской области нами были обнаружены и генотипированы *B. afzelii*, *B. garinii* и *B. lusitaniae*, которые считаются патогенными для человека, и *B. valaisiana*, патогенность которой обсуждается [21]. Уровень инфицированности (15,5%) соотносится с ранее проведёнными исследованиями на территории Ленинградской и Калининградской областей [12]. *B. afzelii* и *B. garinii* — наиболее распространённые

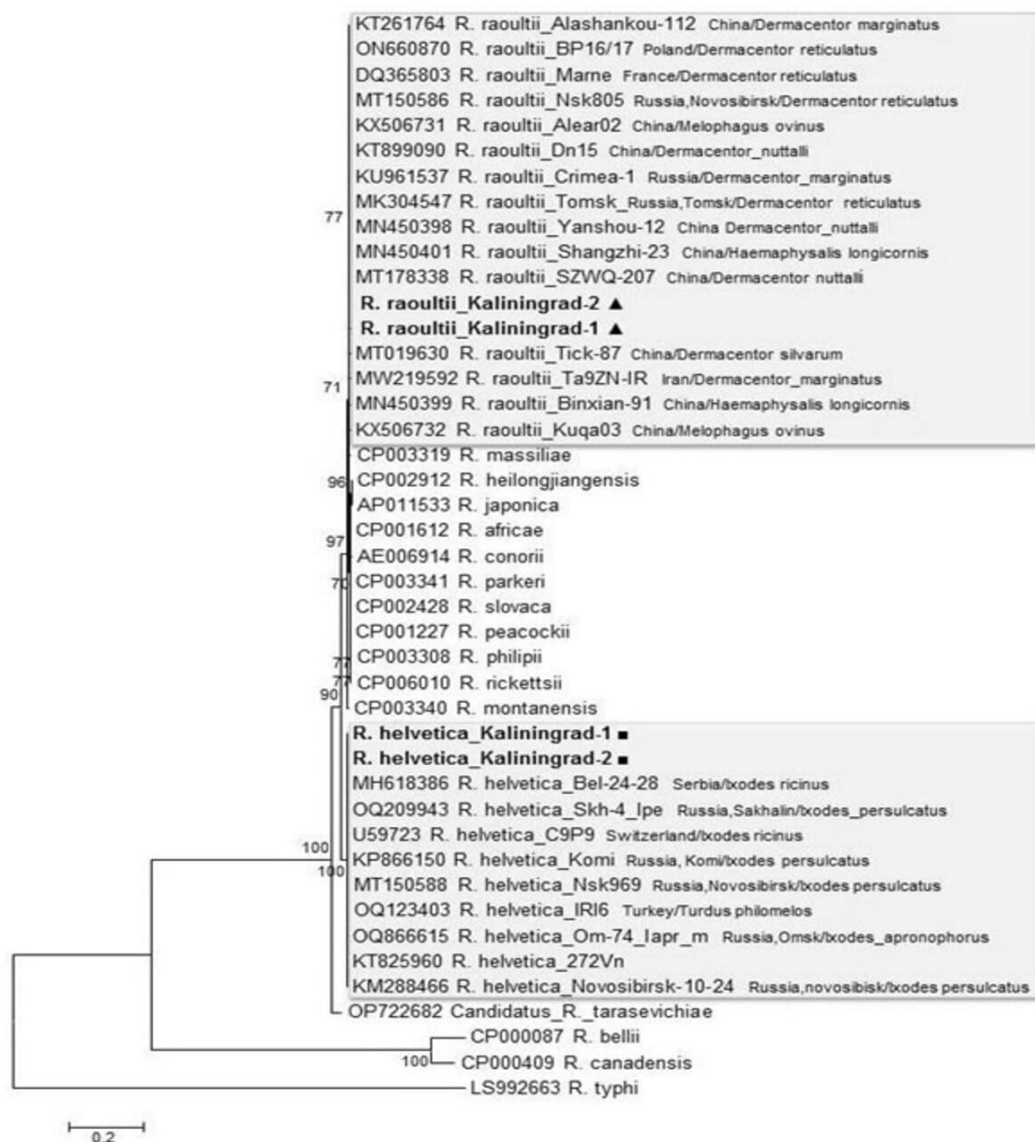


Рис. 3. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gltA* выявленных изолятов риккетсий.

Чёрными треугольниками отмечены последовательности, полученные из клеща *D. reticulatus*, чёрными квадратами — из клеща *I. ricinus*.

Fig. 3. Dendrogram of nucleotide sequences of the *gltA* gene fragment for identified *Rickettsia* isolates. Black triangles — sequences derived from *D. reticulatus* tick; black squares — sequences derived from *I. ricinus* tick.

возбудители клещевого боррелиоза у человека и наиболее часто обнаруживаются в клещах *I. ricinus*. Впервые на территории Калининградской области показана циркуляция *B. lusitaniae*. Следует отметить, что *B. lusitaniae* в основном распространена в странах Средиземноморского региона, таких как Португалия, Марокко и Тунис. В более северных широтах данный патоген обнаруживался в Австрии, Словакии, Украине и Латвии [22].

В клещах *D. reticulatus* не удалось выявить генетических маркеров боррелиоза, хотя была исследована весьма представительная выборка клещей этого вида. Ранее аналогичная ситуация была зарегистрирована в Томске, где удалось индивидуально исследовать 315 клещей этого вида, собранных

в городских биотопах [11]. В Томских городских биотопах обнаружено более чем 200-кратное увеличение численности клещей *D. reticulatus* фактически в течение 2015 г. Именно взрывное нарастание численности *D. reticulatus* позволило собрать в 2016–2017 гг. значительное количество этих клещей и оценить их роль в передаче клещевых инфекций в Томске.

Риккетсии, переносимые иксодовыми клещами, являются инфекционными агентами, способными вызывать заболевание человека. На территории Калининградской области нам впервые удалось установить факт циркуляции двух видов риккетсий из группы клещевой пятнистой лихорадки: *R. helvetica* и *R. raoultii*. Зарегистрированный уровень инфи-

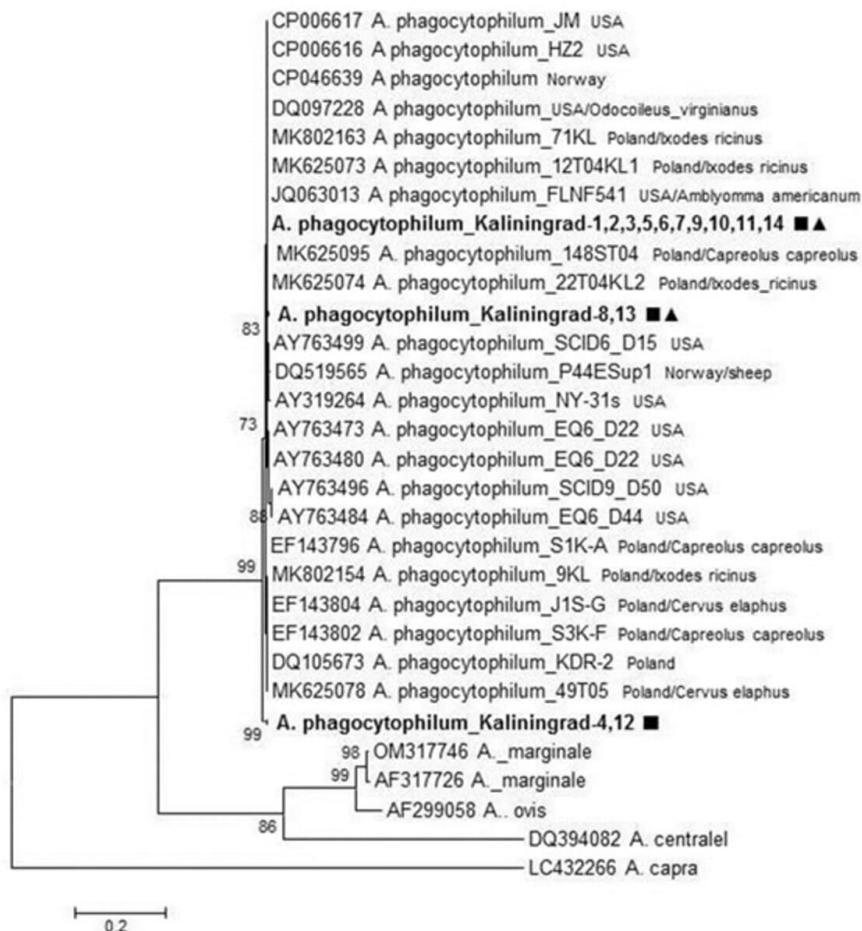


Рис. 4. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *msp2* выявленных изолятов *A. phagocytophilum*.

Чёрными треугольниками отмечены последовательности, полученные из клеща *D. reticulatus*, чёрными квадратами — из клеща *I. ricinus*.

Fig. 4. Dendrogram of nucleotide sequences of the *msp2* gene fragment for identified *A. phagocytophilum* isolates. Black triangles — sequences derived from *D. reticulatus* ticks; black squares — sequence derived from *I. ricinus* ticks

цированности *R. helvetica* клещей *I. ricinus* составил 2,6%. В других странах Балтийского региона он колеблется от 5 до 10% [23]. Однако клещи *D. reticulatus* были инфицированы *R. raoultii* в 21,2% случаев. При этом в Литве и Латвии аналогичный показатель достигает 38%, в Германии — 80% [24, 25]. На территории России уровень инфицированности *D. reticulatus* данным видом риккетсий может варьировать в различных регионах от 21,9% до 45%. ДНК *R. helvetica* была найдена у клещей *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. pavlovskiy* и *I. trianguliceps* в различных регионах северной Евразии [10, 26, 27]. Описаны случаи заболевания человека, при этом у пациентов с риккетсиозом, вызванным *R. helvetica*, наблюдалась лихорадка, редко появлялась сыпь, описаны случаи перимииокардита и менингита.

R. conorii subsp. *raoultii* была описана как новый вид риккетсий в 2008 г. после изучения прототипного штамма *R. raoultii* Kharbarovsk, выделенного в 2005 г. из клеща *D. silvarum* в Хабаров-

ском крае [28]. В последующих исследованиях *R. raoultii* была обнаружена у клещей *D. reticulatus*, *D. marginatus* и *D. nuttalli* в ряде регионов азиатской части России (Омская область, Республика Бурятия), в Казахстане, в Китае и Монголии [19, 20]. Риккетсии, генетически близкие *R. raoultii*, выявлены в клещах *Haemaphysalis hystricis* в Японии и в клещах *H. ornithophila*, *H. shimoga*, *H. lagrangei* в Таиланде, а также в клещах *D. marginatus* в Грузии, Турции и в европейских странах [29].

Серологическими методами и путём выявления ДНК в крови больных подтверждена роль *R. raoultii* наряду с *R. slovaca* в качестве этиологического агента синдрома TIBOLA, который ассоциируется с клещами рода *Dermacentor* spp. [30]. У больных развивается астенический синдром, в четверти случаев наблюдается лихорадка (> 38°C). У большинства пациентов эритема сохраняется до 1–2 мес. В случае локализации укуса клеща в волосяной части головы примерно у трети пациентов

развивается стойкое облысение в месте заживления укуса. При этом случаев заболевания риккетсиозами человека в Калининградской области пока не описано.

Впервые выявленный в работе факт наличия генетического материала *A. phagocytophilum* в клещах *I. ricinus* и *D. reticulatus* показывает активную циркуляцию данного возбудителя в Калининградской области. Уровень инфицированности клещей *D. reticulatus* и *I. ricinus* (0,2 и 1,4% соответственно) соотносится с аналогичными показателями для таких стран, как Дания, Швеция, Норвегия и Германия, где патоген обнаруживается в 1–5% иксодовых клещей [23]. Филогенетический анализ показывает одновременную циркуляцию не менее 3 геновариантов *A. phagocytophilum*. Заболевание гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ) впервые описано на Дальнем Востоке России ещё в 2000 г. Позднее подтверждённые случаи заболевания отмечены в Пермской, Новосибирской областях и на Алтае. Клиническое течение ГАЧ очень полиморфно: от лёгких, субклинических форм до крайне тяжёлых, летальных случаев, которые составляют 0,5–1,0% и обычно связаны с развитием вторичных инфекций. Для заболевания характерно появление головных и мышечных болей, развитие лихорадки. Менее чем у половины больных могут наблюдаться тошнота, рвота, анорексия, диарея, боли в брюшной области и суставах, кашель. В большинстве случаев у больных ГАЧ отмечают лейкопению, тромбоцитопению, а также повышенный уровень аминотрансфераз печени и С-реактивного белка в сыворотке крови. Заболевание ГАЧ на территории Калининградской области не зарегистрировано.

Высокий уровень инфицированности иксодовых клещей риккетсиями и анаплазмами в Калининградской области, наличие постоянных контактов населения с клещами позволяет ожидать появления случаев инфицирования людей риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки и анаплазмами. Диагностика этих заболеваний может быть затруднена из-за несовершенства их лабораторной диагностики. Эти инфекционные агенты не культивируются классическими микробиологическими методами, а генетический материал возбудителей можно обнаружить в клиническом материале от больных в очень узком временном диапазоне. Это актуализирует исследование по сероэпидемиологическому мониторингу данных инфекций у населения, проживающего в Калининградской области, для уточнения их распространения в настоящее время.

Заключение

В коллекции клещей *I. ricinus* и *D. reticulatus*, собранной в 33 различных биотопах в Калининградской области в 2021–2022 гг., обнаружена ДНК 6 различных видов возбудителей клещевых инфек-

ций бактериальной и протозойной природы. Секвенирование фрагментов геномов этих возбудителей, их филогенетический анализ позволили идентифицировать и генотипировать следующие виды возбудителей клещевых инфекций: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *R. helvetica*, *R. raoultii* и *A. phagocytophilum*. При этом *R. helvetica*, *R. raoultii* и *A. phagocytophilum* были выявлены впервые в данном регионе как в клещах *I. ricinus*, так и в клещах *D. reticulatus*. Полученные данные подтверждают необходимость постоянного мониторинга циркуляции возбудителей боррелиозов, риккетсиозов и анаплазмоза в природных очагах клещевых инфекций в Калининградской области, дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этих инфекций, включая выявление возможных случаев заболевания человека риккетсиозами и ГАЧ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004;10(12):1040–55. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x>
- Defaye B., Moutailler S., Pasqualini V., Quilichini Y. A systematic review of the distribution of tick-borne pathogens in wild animals and their ticks in the mediterranean Rim between 2000 and 2021. *Microorganisms.* 2022;10(9):1858. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091858>
- Ni X.B., Cui X.M., Liu J.Y., et al. Metavirome of 31 tick species provides a compendium of 1,801 RNA virus genomes. *Nat. Microbiol.* 2023;8(1):162–73. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01275-w>
- Kiewra D., Krysmann A. Interactions between hard ticks (*Ixodidae*) and bacterial tick-borne pathogens. *Ann. Parasitol.* 2023;69(1):7–16. DOI: <https://doi.org/0.17420/ap6901.502>
- Hansford K.M., Wheeler B.W., Tschirren B., Medlock J.M. Questing *Ixodes ricinus* ticks and *Borrelia* spp. in urban green space across Europe: A review. *Zoonoses Public Health.* 2022;69(3):153–66. DOI: <https://doi.org/10.1111/zph.12913>
- Moraga-Fernández A., Muñoz-Hernández C., Sánchez-Sánchez M., et al. Exploring the diversity of tick-borne pathogens: The case of bacteria (*Anaplasma*, *Rickettsia*, *Coxiella* and *Borrelia*) protozoa (*Babesia* and *Theileria*) and viruses (*Orthonairovirus*, tick-borne encephalitis virus and louping ill virus) in the European continent. *Vet. Microbiol.* 2023;286:109892. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109892>
- Alekseev A.N., Dubinina H.V., Jushkova O.V. First report on the coexistence and compatibility of seven tick-borne pathogens in unfed adult *Ixodes persulcatus* Schulze (*Acarina: Ixodidae*). *Int. J. Med. Microbiol.* 2004;293(Suppl. 37):104–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1433-1128\(04\)80015-9](https://doi.org/10.1016/s1433-1128(04)80015-9)
- Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Свирин К.А. и др. Генотипирование возбудителей клещевых инфекций и определение видового состава клещей, нападающих на людей в г. Новосибирске и его пригородах. *Инфекция и иммунитет.* 2022;12(6):1103–12. Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Svirin K.A., et al. Genotyping of tick-borne pathogens and determination of human attacking tick species in Novosibirsk and its suburbs. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2022;12(6):1103–12. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GOT-1979>
- Kartashov M.Yu., Glushkova L.I., Mikryukova T.P., et al. Detection of *Rickettsia helvetica* and Candidatus *R. tarasevi-*

- chiae* DNA in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Northeastern European Russia (Komi Republic). *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8(4):588–92.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.001>
10. Rar V., Livanova N., Tkachev S., et al. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskiyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasit. Vectors.* 2017;10(1):258.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2186-5>
11. Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Кривошеина Е.И., и др. Генотипирование возбудителей клещевых инфекций в клещах *Dermacentor reticulatus*, собранных в городских биотопах г. Томска. *Паразитология.* 2019;53(5):355–69. Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Krivosheina E.I., et al. Genotyping of tick-borne infections in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in urban foci of Tomsk. *Parazitologiya.* 2019;53(5):355–69.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0031184719050016>
EDN: <https://elibrary.ru/xodhop>
12. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Van De Pol I., Schouls L.M. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. *J. Clin. Microbiol.* 2101;39(6):2237–42.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.39.6.2237-2242.2001>
13. Панферова Ю.А., Ваганова А.Н., Фрейлихман О.А., и др. Распространенность генетических маркеров *Borrelia burgdorferi sensu lato* у кровососущих клещей в парковых зонах Санкт-Петербурга. *Инфекция и иммунитет.* 2020;10(1):175–9. Panferova Yu.A., Vaganova A.N., Freilikhman O.A., et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genetic markers in blood-sucking ticks in suburban park zones in Saint Petersburg. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2020;10(1):175–9.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-POB-806>
14. Laaksonen M., Klemola T., Feuth E., et al. Tick-Borne pathogens in Finland: comparison of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* in sympatric and parapatric areas. *Parasit. Vectors.* 2018;11(1):556.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3131-y>
15. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodinae*. Ленинград;1977. Filippova N.A. *Ixodid Ticks Subfamily Ixodinae*. Leningrad;1977.
16. Roux V., Rydkina E., Eremeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1977;47(2):252–61.
DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-252>
17. Levin M.L., Ross D.E. Acquisition of different isolates of *Anaplasma phagocytophilum* by *Ixodes scapularis* from a model animal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2004;4(1):53–9.
DOI: <https://doi.org/10.1089/153036604773082997>
18. Igolkina Y.P., Rar V.A., Yakimenko V.V., et al. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: identification of a new *Candidatus Rickettsia* species. *Infect. Genet. Evol.* 2015;34:88–93.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.015>
19. Speck S., Derschum H., Damdindorj T., et al. *Rickettsia raoultii*, the predominant *Rickettsia* found in Mongolian *Dermacentor nuttalli*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3(4):227–31.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.04.001>
20. Wen J., Jiao D., Wang J.H., et al. *Rickettsia raoultii*, the predominant *Rickettsia* found in *Dermacentor silvarum* ticks in China–Russia border areas. *Exp. Appl. Acarol.* 2014;63(4):579–85.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9792-0>
21. Strle F., Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;37:51–110.
DOI: <https://doi.org/10.1159/000213070>
22. Norte A.C., Boyer P.H., Castillo-Ramirez S., et al. The population structure of *Borrelia lusitanae* is reflected by a population division of its *Ixodes* vector. *Microorganisms.* 2021;9(5):933.
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050933>
23. Quarsten H., Henningsson A., Krogfelt K.A., et al. Tick-borne diseases under the radar in the North Sea Region. *Ticks Tick Borne Dis.* 2023;14(4):102185.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102185>
24. Arz C., Król N., Imholt C., et al. Spotted fever group rickettsiae in ticks and small mammals from grassland and forest habitats in Central Germany. *Pathogens.* 2023;12(7):933.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12070933>
25. Răileanu C., Tauchmann O., Silaghi C. Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus* with *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* and the associated tick-borne pathogens near the German Baltic coast. *Parasit. Vectors.* 2022;15(1):65.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05173-2>
26. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., et al. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006;1078:378–83.
DOI: <https://doi.org/10.1196/annals.1374.075>
27. Igolkina Y., Bondarenko E., Rar V., et al. Genetic variability of *Rickettsia* ssp. in *Ixodes persulcatus* ticks from continental and island areas of the Russian Far East. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(6):1284–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.06.005>
28. Mediannikov O., Matsumoto K., Samoilenko I., et al. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008;58(Pt. 7):1635–9.
DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64952-0>
29. Guccione C., Colomba C., Iaria C., Cascio A. Rickettsiales in the WHO European Region: an update from a One Health perspective. *Parasit. Vectors.* 2023;16(1):41.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05646-4>
30. Oteo J.A., Aránzazu P. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3(5-6):271–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.035>

Информация об авторах

Карташов Михаил Юрьевич — к.б.н., с.н.с. отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Волчев Евгений Георгиевич — аспирант Института живых систем Балтийского федерального университета им. И. Канта, Калининград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7401-3678>

Кривошеина Екатерина Ильинична — м.н.с. отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Свирин Кирилл Андреевич — м.н.с. отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9083-1649>

Information about the authors

Mikhail Yu. Kartashov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Evgenii G. Volchev — postgraduate student, Institute of Living Systems, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7401-3678>

Ekaterina I. Krivosheina — junior researcher, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Терновой Владимир Александрович — к.б.н., в.н.с., зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Локтев Валерий Борисович[✉] — д.б.н., профессор, г.н.с. отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, valeryloktev@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Участие авторов: *Карташов М.Ю.* — методология и дизайн исследования, геномные исследования, биоинформационный анализ, написание рукописи; *Волчев Е.Г.* — организация сбора и формирование коллекции иксодовых клещей, их идентификация и анализ первичных полевых данных, написание рукописи; *Кривошеина Е.И.*, *Свирин К.А.*, *Терновой В.А.* — геномные исследования, биоинформационный и статистический анализ, написание рукописи; *Локтев В.Б.* — концептуализация исследования, написание и редактирование рукописи. 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 22.02.2024;
принята к публикации 10.04.2024;
опубликована 29.04.2024

Kirill A. Svirin — junior researcher, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9083-1649>

Vladimir A. Ternovoi — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Valery B. Loktev[✉] — D. Sci. (Biol.), Professor, chief researcher, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, valeryloktev@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Author contribution: *Kartashov M.Yu.* — methodology and design of the research, genomic studies, bioinformatic analysis, writing the manuscript; *Volchev E.G.* — management and collection of ixodes ticks, their identification, analyses of fields data, writing the manuscript; *Krivosheina E.I.*, *Svirin K.A.*, *Ternovoi V.A.* — genomic studies, bioinformatics and statistical analysis, visualization, manuscript writing; *Loktev V.B.* — conceptualization of the study, writing and editing the manuscript. 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 22.02.2024;
accepted for publication 10.04.2024;
published 29.04.2024



Полиморфизм генов рецепторов герминации спор у штаммов *Bacillus anthracis* основных генетических линий

Еременко Е.И.[✉], Рязанова А.Г., Печковский Г.А., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н.

Ставропольский противочумный институт, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. Генетическая структура глобальной популяции *Bacillus anthracis* характеризуется неравной распространённостью изолятов основных генетических линий А, В и С, причина которой не установлена. Актуально определение особенностей генов, кодирующих факторы, определяющие существование этого патогена на внутри- и внеорганизменной стадиях жизненного цикла, которые могут влиять на распространённость штаммов.

Цель работы — характеристика генов и белков герминации спор у штаммов *B. anthracis* разных генетических линий.

Материалы и методы. Изучены полногеномные последовательности 46 штаммов *B. anthracis* и штамма *CI B. cereus biovar anthracis* из базы данных GenBank NCBI. Анализ *in silico* проводили в программах «BLASTn», «MEGA X», «Tandem Repeat Finder».

Результаты. Количество однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), инделов и псевдогенов у штаммов *B. anthracis* линии В было больше в 2,7–25,6 раза, линии С — в 2,0–3,5 раза, а у штамма *B. cereus biovar anthracis* — в 20–2841 раз, чем у штаммов линии А. Значимые замены в генах, приводящие к изменению аминокислотного состава 10 белков рецепторов герминации, также значительно чаще встречались у штаммов *B. anthracis* линий В, С и штамма *B. cereus biovar anthracis*.

Идентифицированы неописанные VNTR в пределах гена *gerHA* с единицей повтора 78 и 117 п.н. и SNP в гене *gerM*, варьирующие между и внутри изолятов разных генетических линий. Показано, что 6 генов рецепторов герминации имеют редкие стартовые кодоны.

Заключение. Большее количество несинонимичных SNP в генах рецепторов герминации спор с изменением аминокислотного состава и, вероятно, функции белков у штаммов *B. anthracis* основных генетических линий В, С и *B. cereus biovar anthracis*, чем у штаммов линии А, может определять их ограниченные адаптационные возможности и быть одним из объяснений меньшей распространённости по сравнению с линией А. Различия в генах *gerHA* и *gerM* позволяют дифференцировать основные генетические линии В и С от А.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, генетические линии, гены и белки рецепторов герминации спор

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: Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Печковский Г.А., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Полиморфизм генов рецепторов герминации спор у штаммов *Bacillus anthracis* основных генетических линий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2): 237–247.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-483>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-483>

Polymorphism of spore germination receptor genes in *Bacillus anthracis* strains of major genetic lineages

Evgeny I. Eremenko[✉], Grigorii A. Pechkovskii, Alla G. Ryazanova, Sergey V. Pisarenko, Dmitry A. Kovalev, Lyudmila Yu. Aksenova, Olga V. Semenova, Alexander N. Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. The genetic structure of the global population of *Bacillus anthracis* characterized by an unequal distribution of isolates of the main genetic lineages A, B and C, the reason for which is unknown. Determining the characteristics of genes encoding factors that determine the existence of this pathogen at the intra- and extra organismal stages of the life cycle, which can influence the prevalence of strains, is relevant.

Aim — characterization of the genes and proteins of spore germination in strains of the anthrax pathogen of different genetic lineages.

Materials and methods. Whole genome sequences of 46 *B. anthracis* strains and the CI strain of *B. cereus biovar anthracis* from the NCBI GenBank database studied. In silico analysis carried out using the programs “BLASTn”, “MEGA X”, “Tandem Repeat Finder”.

Results. The number of SNPs, indels and pseudogenes in *B. anthracis* strains of line B was 2,7–25,6 times higher, in line C 2–23,5 times, and in the *B. cereus biovar anthracis* strain was 20–2841 times higher than in strains of line A. Significant substitutions in genes leading to changes in the amino acid composition of 10 germination receptor proteins were also significantly more common in *B. anthracis* strains of lines B, C and the *B. cereus biovar anthracis* strain.

Undescribed VNTRs within the *gerHA* gene with repeat units of 78 and 117 bp identified, varying between and within isolates of different genetic lineages. Six germination receptor genes have been shown to have rare starting codons.

Conclusion. A larger number of non-synonymous SNPs in the genes of spore germination receptors with changes in the amino acid composition of proteins in *B. anthracis* strains of the main genetic lines B, C and *B. cereus biovar anthracis* than in strains of line A suggests their limited adaptive capabilities and may be one of the explanations for the lower prevalence compared to line A. Differences in the *gerHA* and *gerM* genes make it possible to differentiate the major B and C genetic lineages from A.

Keywords: *Bacillus anthracis*, genetic lineages, genes and proteins of spore germination receptors.

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: Eremenko E.I., Pechkovskii G.A., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N. Polymorphism of spore germination receptor genes in *Bacillus anthracis* strains of major genetic lineages. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):237–247.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-483>

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

Введение

Глобальная генетическая структура *Bacillus anthracis* представлена 3 основными генетическими линиями: А, В и С. Линия А, присутствующая повсеместно, охватывает около 90% всей популяции; линия В, встречающаяся преимущественно в некоторых регионах, составляет примерно 10%. К линии С относятся 3 штамма (< 1%), выделенные в США [1–3]. Из 363 геномов штаммов, депонированных в GenBank к настоящему времени, 5 (2002013094, 2000031021, 2000031052, A1055, A3783) могут быть отнесены к линии С. Отдельной генетической линией являются штаммы *B. cereus biovar anthracis*, способные вызывать сибирскую язву у диких животных в лесах Западной Африки [4, 5]. Причины такого неравномерного количественного, а также географического распределения разных линий *B. anthracis* неизвестны. Предполагается, что за этим стоит разная способность к адаптации, определяемая как степенью патогенности, так и эффективностью споруляции и прорастания спор. В нашей предыдущей работе показаны многократное превышение числа полиморфизмов в геномах, включая гены факторов патогенности, у штаммов линий В и С по сравнению с линией А, определены значимые замены в

хромосомных и плазмидных генах, потенциально влияющие на вирулентность [6].

B. anthracis является возбудителем сибирской язвы — особо опасной зоонозной инфекции с глобальным распространением, а также агентом биологического оружия и биотерроризма в силу высокой патогенности и способности образовывать в окружающей среде стойкие споры. Циклическая смена спорообразования, прорастания покоящихся спор, вегетативного роста и нового спорообразования присуща всем представителям рода *Bacillus*. У сапрофитных почвенных бацилл все эти процессы проходят в почве, но патогенному сибиреязвенному микробу для поддержания жизненного цикла необходимо прорастание спор при попадании в организм чувствительного хозяина, вегетативное размножение в процессе патогенеза с выделением вегетативных бацилл в окружающую среду, где происходят споруляция и сохранение покоящихся спор в почве неопределённо долго, вплоть до нового инфицирования чувствительных животных [3]. Очевидно, что споруляция и прорастание спор — фундаментальные процессы, необходимые для поддержания существования *B. anthracis* как вида, наряду с его патогенными свойствами.

Образование спор делает возможным выживание *B. anthracis* в окружающей среде годами, до того момента, когда они вступают в контакт с подходящим млекопитающим хозяином, прорастают и вызывают сибиреязвенную инфекцию. Хотя состояние покоя может продолжаться в течение длительного периода, прорастание спор — очень быстрый процесс, позволяющий *B. anthracis* быстро размножаться и распространяться. Начало прорастания, или герминация спор, зависит от соответствующего взаимодействия герминанта с герминантным рецептором [7].

Для *B. anthracis* питательными веществами — герминантами являются в первую очередь аминокислоты и пуриновые нуклеозиды, которые взаимодействуют с их специфичными рецепторами, расположенными на внутренней мембране спор [8–10]. Аланин или инозин обычно служат первичными герминантами с отдельными аминокислотами (L-гистидин, L-пролин, L-триптофан и L-тирозин), функционирующими как когерминанты. Аланин способен вызывать прорастание спор сам по себе, хотя и в очень высоких концентрациях [8, 11]. Инозин может сочетаться с разнообразием L-аминокислот, включая L-гистидин, L-цистин, L-метионин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-валин, L-триптофан, L-тирозин, как и с первичным герминантом аланином. Инозин, однако, сам по себе недостаточен для прорастания спор *B. anthracis* [9].

Прежде чем может начаться прорастание, герминанты должны каким-то образом пройти через внешние слои споры, чтобы достичь своих рецепторов, расположенных во внутренней мембране.

После распознавания рецепторами их специфичных герминантов инициируется каскад событий. Запасы дипиколиной кислоты и ассоциированного с ними иона кальция освобождаются из ядра споры, позволяя воде поступать в спору и начинать регидратацию [12]. Активация литических ферментов, гидролизующих пептидогликан в кортексе споры, приводит к дальнейшей регидратации споры [13]. Затем возобновляется синтез РНК, белка и ДНК с превращением в вегетативную бактерию. В оптимальных условиях весь процесс очень быстрый, происходящий в течение минут.

Пять рецепторов герминантов *B. anthracis* кодируются трицистронными оперонами, *gerH*, *gerK*, *gerL* и *gerS* локализуются на хромосоме, а *gerX* — на плазмиде вирулентности pXO1 [14, 15] Существуют два дополнительных рецептороподобных оперона — *gerA* и *gerY*, но они содержат мутации со сдвигом рамки считывания и не играют роль в прорастании [10]. Оперон *gerP*, включающий 6 генов, может быть вовлечён в процесс доставки герминантов к их рецепторам во внутренней мембране споры [16].

Данных относительно существования различий в генах и ферментах герминации спор у

штаммов разных основных генетических линий *B. anthracis* в доступной литературе нет.

Актуальность проведённой работы определяется отсутствием данных, которые значимы для развития представлений о различиях в генетическом аппарате герминации спор у штаммов разных основных генетических линий, связанных с их адаптационными возможностями, потенциально определяющими неравномерность их распределения.

Цель данной работы — характеристика генов и белков герминации спор у штаммов *B. anthracis* разных генетических линий.

Материалы и методы

Исследовали полные геномы 46 штаммов из базы данных GenBank NCBI, относящихся к основным генетическим линиям А (30 изолятов), В (11), С (5), геном штамма С1 *B. cereus biovar anthracis*. Данная выборка репрезентативна, в ней представлены все известные 14 canSNP-групп, отражающих глобальную филогенетическую структуру *B. anthracis*.

Идентификаторы NCBI RefSeq для геномов¹:

GCF_000008445.1, GCF_009831565.1,
GCF_000167335.1, GCF_003063965.1,
GCF_003064045.1, GCF_003860145.1,
GCF_000793525.1, GCF_000832965.1,
GCF_000310045.1, GCF_000167235.1,
GCF_000534935.2, GCF_000258885.1,
GCF_000278385.1, GCF_000832465.1,
GCF_001273005.1, GCF_001273085.1,
GCF_000167295.1, GCF_002896575.1,
GCF_014249775.1, GCF_003227955.1,
GCF_000831505.1, GCF_000832745.1,
GCF_003064005.1, GCF_000008165.1,
GCF_000583105.1, GCF_000833275.1,
GCF_022221345.1, GCF_000743805.1,
GCF_900014355.1, GCF_002356575.1,
GCF_000143605.1, GCF_000181675.2,
GCF_001277955.1, GCF_000167315.1,
GCF_000832785.1, GCF_002980615.3,
GCF_000833125.1, GCF_022221285.1,
GCF_006088855.1, GCF_000725325.1,
GCF_001936375.1, GCF_022221085.1,
GCF_021390035.1, GCF_000742655.1,
GCF_000782995.1, GCF_000167255.1,
GCF_022221185.1.

Последовательности генов и белков выровняли в программе «MEGA X» с референс-штаммом Ames Ancestor canSNP-группы А.Br.Ames.

Анализ геномов проводили *in silico*, используя геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: NC_007530.2; NC_007322.2; NC_007323.3; NCBI RefSeq: GCF_000008445.1) в качестве референсного. Идентификацию полиморфизмов осуществ-

¹ NCBI. Genomes & Maps.

URL: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/833/275>

вляли в программах BLASTn, BLASTp, MEGA X, MAUVE, Tandem Repeat Finder и на ресурсе NCBI Protein Database.

Результаты

Большинство генов рецепторов герминации спор организованы в полицистронные опероны.

Данные о полиморфизмах генов рецепторов герминации приведены в **таблице**.

Основная генетическая линия А

Мутации в виде индел встречались чаще других полиморфизмов, с меньшей частотой отмечены однонуклеотидные замены (SNP), часть из которых приводила к замене аминокислот (а.к.), реже всего регистрировались псевдогены.

Трицистронный оперон *gerH*. Ген *gerHA* — 3 варианта, 2 с отличающимися размерами от референсного ввиду делеций. Вариант 1 — референсный, 2244 п.н., 747 а.к.; вариант 2 — 2166 п.н., 721 а.к.; вариант 3 — 2088 п.н., 695 а.к.

Трицистронный оперон *gerK*. Белок GerKA — 1 вариант. Белок GerKB — 1 вариант, как у референсного штамма, у гена *gerKB* стартовый кодон GTG. Белок GerKC — 1 вариант.

Трицистронный оперон *gerL*. Ген *gerLA* — 3 варианта, отличающиеся размерами (1479, 1437 и 1470 п.н.). Один из вариантов имеет 2 стартовых кодона: GTG и ATG. Два других гена оперона *gerL* — *gerLB* и *gerLC* имеют по 1 варианту, у *gerLB* стартовый кодон TTG.

Ген *gerM* имеет 1 вариант.

Оперон *gerP* включает 6 генов: *A, B, C, D, E, F*. Гены *gerPA, gerPB* и *gerPD* представлены только в 1 варианте. Ген *gerPB* имеет стартовый кодон TTG. Ген *gerPC* — 2 варианта, отличающиеся одним несинонимичным SNP. Ген *gerPE* — 2 варианта, также отличающиеся 1 несинонимичным SNP. Кроме гена *gerPF* в опероне *gerP*, есть ортолог вне оперона.

Трицистронный оперон *gerS* — все 3 гена (*gerSA, gerSB, gerSC*) имеют только по 1 варианту, идентичному референс-штамму. У гена *gerSB* стартовый кодон GTG.

Трицистронный оперон *gerX* — из генов оперона 2 (*gerXA* и *gerXB*) имеют по 1 варианту, идентичному референс-штамму. Ген *gerXC* представлен в 2 вариантах, различающихся 1 несинонимичным SNP.

Трицистронный оперон *gerY* — из 3 генов оперона 1 ген — *gerYA* имеет такой же вариант, как у референс-штамма. Ген *gerYB* имеет мутации со сдвигом рамки считывания, превращающие его в псевдоген. Ген *gerYC* имеет 2 варианта разных размеров. Гены обоих вариантов имеют редко встречающиеся стартовые кодоны АТТ.

Частота встречаемости SNP составила 0,17, для инделов — 0,27, для псевдогенов — 0,1 на 1 ге-

ном. Таким образом, инделы встречались чаще, чем SNP.

В целом для 25 генов было 34 варианта белков.

Основная генетическая линия В

Из 25 генов 12 представлены только 1 вариантом, соответствующим референсному штамму.

Трицистронный оперон *gerH*. Из 3 генов (*gerHA, gerHB, gerHC*) только *gerHA* был вариативным и представлен 4 вариантами разных размеров: вариант 1 размером 2385 п.н., вариант 2 — 2322 п.н., вариант 3 — 2190 п.н., вариант 4 — 2166 п.н.

Трицистронный оперон *gerK*. Гены *gerKB* и *gerKC* не вариативны, идентичны референсному штамму. Ген *gerKB* имеет стартовый кодон GTG. Ген *gerKA* — два варианта одного размера. Вариант 2 содержит 1 несинонимичный SNP.

Трицистронный оперон *gerL* — 2 гена оперона, *A* и *B* не вариативны и соответствуют референсному штамму. Ген *gerLA* начинается с триплета GTG, ген *gerLB* — с триплета TTG. Ген *gerLC* — 2 варианта, второй выглядит как псевдоген.

Ген *gerM* — один вариант, отличающийся от референсного 12 SNP, один из которых несинонимичный.

Оперон *gerP* — из 6 генов вариативны 2: *gerPE* и *gerPF*. Ген *gerPB* имеет стартовый кодон TTG. Второй вариант *gerPE* отличается от референсного 1 несинонимичным SNP. Ген *gerPF* — как и у штаммов линии А, кроме гена оперона *gerP*, есть второй ген с таким обозначением вне оперона. Оба не отличаются от референсного штамма.

Трицистронный оперон *gerS*. Гены *gerSA* и *gerSB* — по 2 варианта одного размера, у *gerSA* один отличается от референсного 1 несинонимичным SNP, второй — 2 несинонимичным SNP. У гена *gerSB* — один соответствует референсному, второй отличается несинонимичным SNP, оба имеют стартовый кодон GTG.

Трицистронный оперон *gerX*. Гены *gerXB* и *gerXC* имеют по 2 варианта. Вариант 1 *gerXB* соответствует референсному. Вариант 2 имеет 1 несинонимичный SNP. *gerXC* имеет 2 варианта. Вариант 1 имеет 1 несинонимичный SNP. Вариант 2 имеет 2 несинонимичных SNP. *gerXA* имеет 1 вариант, соответствующий референсному.

Трицистронный оперон *gerY*. Ген *gerYA* — 1 вариант с 2 несинонимичными SNP. Ген *gerYB* — 1 вариант с делецией, дающей сдвиг рамки считывания в гене (псевдоген). Ген *gerYC* — 1 вариант, соответствующий референсному, со стартовым кодоном АТТ.

В целом для линии В идентифицированы 35 вариантов 25 белков. Частота встречаемости была 4,36 для SNP, 1 — для инделов, 0,27 — для псевдогенов. Чаще всего встречались SNP, частоты всех

Структурные и функциональные особенности белков и генов герминации спор у штаммов *B. anthracis* разных генетических линий
 Structural and functional features of proteins and genes for spore germination in *B. anthracis* strains of different genetic lineages

Ген Gene	Основные генетические линии Major Lineages												Всего Total					
	A				B				C					<i>B. cereus biovar anthracis</i>				
	SNP	INDEL	псевдо- гены pseudo- genes	варианты белков protein variants	SNP	INDEL	псевдо- гены pseudo- genes	варианты белков protein variants	SNP	INDEL	псевдо- гены pseudo- genes	варианты белков protein variants		SNP	INDEL	псевдо- гены pseudo- genes	варианты белков protein variants	
<i>gerHA</i>	0	2	0	3	24	9	0	0	4	0	2	0	1	47	1	0	1	94
<i>gerHB</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	73	2	0	1	79
<i>gerHC</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	65	2	0	1	71
<i>gerKA</i>	1	0	0	1	1	0	1	2	2	0	0	0	1	0	0	1	1	9
<i>gerKB</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	8	0	0	1	12
<i>gerKC</i>	0	2	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	13	0	0	1	21
<i>gerLA</i>	1	2	0	3	0	0	0	1	1	0	0	0	1	4	0	0	1	13
<i>gerLB</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	35	0	0	1	39
<i>gerLC</i>	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	11	0	0	1	17
<i>gerM</i>	0	0	0	1	12	0	0	1	1	12	0	0	1	12	0	0	1	41
<i>gerPA</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4
<i>gerPB</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4
<i>gerPC</i>	1	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2	0	0	1	4
<i>gerPD</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4
<i>gerPE</i>	1	0	0	2	1	0	0	1	1	1	0	0	1	7	0	0	1	4
<i>gerPF</i>	0	0	0	2	0	0	0	2	2	0	0	0	2	0	0	0	2	8
<i>gerSA</i>	0	0	0	1	2	0	0	2	2	1	0	0	2	67	0	0	1	76
<i>gerSB</i>	0	0	0	1	1	0	0	2	2	0	0	0	1	10	0	0	1	16
<i>gerSC</i>	0	0	0	1	1	0	0	2	2	1	0	0	1	10	0	0	1	17
<i>gerXA</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4
<i>gerXB</i>	0	0	0	1	1	0	0	2	2	1	0	0	1	1	0	0	1	8
<i>gerXC</i>	1	0	0	2	3	0	0	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	18
<i>gerYA</i>	0	0	0	1	2	0	0	1	1	2	0	0	1	53	0	0	1	71
<i>gerYB</i>	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	34	0	0	1	42
<i>gerYC</i>	0	1	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	30	0	0	2	37
Всего Total	5	8	3	34	48	11	3	35	20	4	1	28	483	7	2	27	728	
На 1 геном Per 1 genome	0,17	0,27	0,1	4,36	1	0,27	0,2	4	0,8	0,2	0,2	483	7	2	2	2		

Примечание. Жирным курсивом выделены гены, дифференцирующие линию А от линий В и С.
 Note. Genes that differentiate line A from lines B and C are highlighted in bold italics.

полиморфизмов были существенно выше, чем у линии А.

Основная генетическая линия С

Трицистронный оперон *gerH*. Ген *gerHA* — 3 варианта. У штаммов А1055 и А3783 ген имел размер 2244 п.н., соответствующий референсному, у штамма 2002013094 — 2166 п.н., как у варианта 4 линии В, с 1 делецией 78 п.н., отличающей его от референсной последовательности. У штаммов 2000031021 и 2000031052 размер гена был 2088 п.н., с делецией 156 п.н. Остальные 2 гена оперона *gerH* не были вариабельными.

Трицистронный оперон *gerK*. Все 3 гена оперона *gerK* не отличались от референсного, у гена *gerKB* был стартовый кодон GTG. Гены оперона *gerL* не вариабельны, как у штаммов линии В, у *gerLB* стартовый кодон TTG.

Ген *gerM* — у единственного варианта было 11 синонимичных и 1 несинонимичный SNP в сравнении с референсным, как и у гена линии В.

Оперон *gerP* — из 6 генов вариабельны 2. Ген *gerPE* имеет 1 вариант с 1 несинонимичным SNP по сравнению с референсным геном. Ген *gerPF* — как и у штаммов линии А и В, кроме гена оперона *gerP*, есть второй ген с таким обозначением вне оперона. Оба не отличаются от референсного штамма. Ген *gerPB* имеет стартовый кодон TTG.

Оперон *gerS* — из 3 генов вариабельны 2. *gerSA* имеет 2 варианта, 1-й соответствует референсному, 2-й отличается одним несинонимичным SNP. *gerSC* в 1 варианте, отличается одним синонимичным SNP. У гена *gerSB* стартовый кодон GTG.

Оперон *gerX* — из 3 генов вариабельны 2. Ген *gerXB* в одном варианте с 1 несинонимичной нуклеотидной заменой. Ген *gerXC* 1 вариант, ген больших размеров, чем референсный, с 2 инделами и 1 несинонимичным SNP, со сдвигом рамки считывания и образованием псевдогена.

Оперон *gerY* — 3 гена. Ген *gerYA* с 1 вариантом, отличающимся 2 несинонимичными SNP. Ген *gerYB* с 1 вариантом, имеющим 1 несинонимичный SNP. Ген *gerYC* имеет 1 вариант, как у референсного штамма, со стартовым кодоном ATT.

В целом 25 белков герминации спор линии С имели 28 вариантов. Частота встречаемости SNP составляла 4,0, инделов — 0,8, псевдогенов — 0,2 и также была значительно выше, чем у штаммов линии А.

B. cereus biovar anthracis

Из 25 генов 4 не отличались от референсных. Это были гены оперона *gerP A, B, D* и *F*. Ген *gerPC* имел 1 синонимичный и 1 несинонимичный SNP. Ген *gerPE* отличался 7 SNP, 1 из которых несинонимичный. Гены *gerKB* и *gerSB* имели стартовый кодон GTG, *gerLB* и *gerPB* — TTG.

Оперон *gerX* устроен так же, как у штамма 2002013094 линии С. Ген *gerXC* представлен в форме псевдогена. Можно отметить, что *gerXA* идентичен у всех 3 линий *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis*.

В опероне *gerK* ген *gerKA* является псевдогеном из-за присутствия в рамке считывания стоп-кодона.

Остальные гены герминации спор *B. cereus biovar anthracis* имели множество отличий от таковых у *B. anthracis*. Больше всего было SNP (483), из них 113 приводящих к аминокислотным заменам, 7 инделов и 2 псевдогена. В целом 25 белков герминации имели 27 вариантов.

Таким образом, анализ показал, что количество полиморфизмов в генах и белках герминации спор у штаммов *B. anthracis* линии В было в 2,7–25,6 раза, линии С — в 2,0–23,5 раза, а у штамма *B. cereus biovar anthracis* — в 20–2841 раз больше, чем у штаммов линии А. Значимые замены в генах, приводящие к изменению аминокислотного состава белков, также значительно чаще встречались у штаммов линий В, С и штамма *B. cereus biovar anthracis*.

Обсуждение

По результатам анализа *in silico* в геномах штаммов *B. anthracis* и штамма *B. cereus biovar anthracis str CI* определяются 7 полицистронных оперонов рецепторов герминантов: *gerH, gerK, gerL, gerP, gerS, ger X* и *gerY*, а также отдельные гены прорастания спор *gerM* и *spoVAF*. Последний описан как ген белка MULTISPECIES: spore germination protein *SpoVAF*, но он входит в один оперон с генами белков стадии V споруляции *spoVAE, spoVAD, spoVAC, spoVAB* и *spoVAA*. Дистальная часть оперона *spoVA Bacillus subtilis* содержит открытую рамку считывания гена *spoVAF*, кодирующую белок (*SpoVAF*), очень схожий с белками прорастания спор, кодируемых генами *gerAA* и *gerBA*. Рамка считывания фактически перекрывает ген *spoVAE* примерно на 30 остатков, поэтому не ясно, является ли этот ген частью оперона *spoVA* или регулируется отдельно. У штаммов *B. anthracis* рамка считывания гена *spoVAF* перекрывает примерно на 13 остатков ген *spoVAE*. Отметим, что у *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis* в опероне *spoVA* имеются 2 гена *spoVAE*, расположенных один за другим, не перекрываясь.

Трицистронный оперон *gerH* у *B. anthracis* важен для прорастания эндоспор, запускаемого 2 различными путями реакции прорастания, называемыми инозин-гистидиновым и пурин-аланиновым. Вместе эти 2 пути позволяют эндоспорам *B. anthracis* более широко распознавать пурины и аминокислоты, которые могут быть существенны для опосредованного средой прорастания в ор-

ганизме хозяина [9]. Получены данные, которые предполагают, что *gerH* необходим не только для инозинзависимой герминации, но он также способен вызвать полную герминацию в отсутствие всех других рецепторов [7].

Общее количество всех полиморфизмов у гена *gerHA* всех 3 линий *B. anthracis* было наивысшим (112) среди всех генов рецепторов герминации. Нами показано, что *gerHA* имеет несколько вариантов размера: 2088, 2166, 2190, 2244, 2322 и 2385 п.н., отличающихся, кроме SNP, инделами, часть из которых определялась наличием ранее не идентифицированных VNTR. Три варианта *gerHA* отличались размерами ввиду наличия VNTR с единицей повтора размером 78 п.н. в области 392–703 п.н. с числом повторов 3 для штаммов линии А Ames Ancestor (canSNP группа A.Br.Ames), Tsiankovskii-1 и Larissa (canSNP группа A.Br.008/011), 1144 (canSNP группа A.Br. 011/009), Australia 94 (canSNP группа A.Br. Aust94), Western North America (canSNP группа A.Br. WNA), H9401 (canSNP группа A.Br.005/007), A1055 и A3783 линии С.Br. A1055. 2 повтора были у штамма 2002013094 canSNP группы С.Br. A1055. У штаммов Vollum (canSNP группа A.Br.Vollum), V770-NP-R (canSNP группа A.Br.003/004), CZC5 (canSNP группа A.Br.005/006), 2000031021 и 2000031052 (линия С) имелась 1 единица этого повтора. Четыре повтора были у штаммов CNEVA-9066 (canSNP группа В.Br. CNEVA) и HYU01 (canSNP группа В.Br.001/002). Соответствующие белки имели 2, 3 и 4 единицы повтора DSDQGGQQHNSKQDESSQEQQHNSKQD (рис. 1, а). У штамма Kruger В, кроме 3 повторов, были также делеции 719–764 и 768–775 п.н.

VNTR с единицей повтора размером 117 п.н. отмечен у штамма HYU01 (canSNP группа В.Br.001/002) в области 275–508 п.н. (2 повтора), у штаммов Kruger В (canSNP группа В.Br.Kruger В) и Ames Ancestor — одна единица такого размера. Соответствующие белки GerHA имели 2 повтора и 1 единицу повтора DSDQGGQQHNSKQGNSDQGGQQHNSKQGDSQGGQQHNSKQN (рис. 1, б).

Штамм *B. cereus biovar anthracis* CI имел размер *gerHA* 1917 п.н. за счёт делеции, включающей 2 повтора 117 п.н., а также 2 делеции 246–342 и 488–697, 47 SNP, из которых 10 были несинонимичными.

Таким образом, области повторов размером 117 и 78 п.н. частично перекрывались на протяжении 392–508 п.н. В целом у штаммов линии А было 3 варианта *gerHA*, но минимальный вариант — 2088 п.н. — не отмечен у наиболее распространённых canSNP групп А.Br.008/011, А.Br.011/009, а также у штаммов линии В, среди которых встречались 4 варианта генов и белков. Для штамма 2002013094 линии С характерен 1 вариант размером 2166 п.н., который отмечен и у штаммов линий А и В. У этого штамма порядок субъединиц в опероне *gerH* обратный — С-В-А, в отличие от штаммов других линий.

Ранее нами установлено, что у штаммов основной генетической линии В отсутствие амплификации VNTR-локуса Vams34 при MLVA связано с делецией или заменами оснований в области отжига обратного праймера и что эта область приходится на ген прорастания спор *gerHA* штамма *B. anthracis* Ames Ancestor. Кроме того, что данная особенность служит надёжным генетическим маркером и может использоваться для молекулярного субтипирования и дифференциации линий А и С от В, изучение различий генов и влияние их на функцию белков прорастания спор возбудителя сибирской язвы важно, поскольку процесс прорастания спор является критическим в жизненном цикле этого патогена и становлении инфекции [17].

Трицистронный оперон *gerS* у *B. anthracis* опосредует прорастание эндоспор герминантами, содержащими ароматические кольцевые структуры [8]. Все 3 гена *gerS* у штаммов линии А не вариабельны. Ген *gerSA* линии В имеет 2 варианта: вариант 1 для штаммов HYU01 (canSNP группа В.Br.001/002), Kruger В, Zimbabwe 89 и SVA11 (группа В.Br.Kruger В) имеет 1 несинонимичный SNP. Вариант 2 у штамма CNEVA-9066 (группа В.Br.CNEVA) имеет 2 несинонимичных SNP.

Ген *gerSB* у штаммов линии В представлен двумя вариантами: вариант 1 для штаммов Kruger В, SVA11, Zimbabwe 89 (группы В.Br.Kruger В), с 1 SNP в гене имеет 1 замену аминокислот; вариант 2 для штаммов CNEVA-9066 и HYU01 соответствует референсному. Ген *gerSC* имеет 2 варианта: вариант 1 для штаммов Kruger В, SVA11, Zimbabwe 89 (группы В.Br.Kruger В) имеет 1 SNP в гене и 1 замену

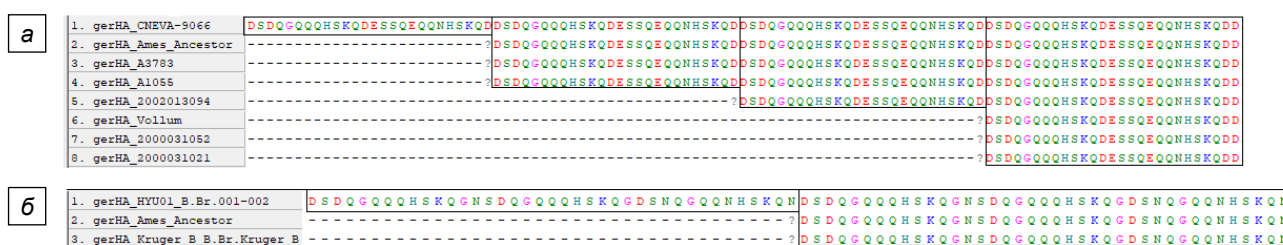


Рис. 1. Области гена *gerHA* с вариабельным числом тандемных повторов (транслированные последовательности).

Fig. 1. Regions of the *gerHA* gene with a variable number of tandem repeats (translated sequences).

аминокислот; вариант 2 для штаммов CNEVA-9066 и NYU01 соответствует референсному.

У линии С 2 варианта — для штаммов 2002013094, 2000031021, A1055 и A3783, как у референсного штамма, и для штамма 2000031052 с несинонимичным SNP 1442G→A(R488H).

Оперон *gerP*, включающий 6 генов, может быть вовлечён в процесс доставки герминантов к их рецепторам во внутренней мембране споры и играет роль в проницаемости споровой оболочки [16]. Гены *gerPA*, *gerPB* и *gerPD* представлены только в 1 варианте. Ген *gerPC* имеет 2 варианта, отличающиеся 1 несинонимичным SNP в гене, ген *gerPE* — 2 варианта, также отличающиеся 1 несинонимичным SNP. Вариант 1 встречается только у штаммов группы A.Br.Ames, вариант 2 — у всех групп линий A, B, C *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis* CI.

Кроме гена *gerPF*, в составе оперона *gerP* есть ортолог с таким обозначением и такого же размера, но другого нуклеотидного состава вне оперона. Оба не отличаются от референсного штамма и имеются у штаммов *B. anthracis* всех линий и у *B. cereus biovar anthracis* CI.

В совокупности профили прорастания отдельных мутантов с делетированным одним из генов оперона *gerP* ($\Delta gerP$) и тройного мутантного штамма с выключенными генами *gerPF*, *gerPF* 2 и *gerPF* 3 оперона *gerP* ($\Delta gerPFnull$) позволяют предположить, что каждый белок GerP играет решающую роль в содействии правильному и быстрому прорастанию. Эта роль может включать в себя попадание питательных веществ в споры, выход дипиколината кальция из спор или и то, и другое [16].

По нашим данным, ген *gerKA* штамма ST11 линии A (canSNP группа A.Br.008/011) содержит синонимичный SNP 1392A→G, штаммы линии В Tyrol 4675, BF1 и BF5 (группа B.Br.CNEVA) — несинонимичный SNP 211T→G (L71V). У штаммов линии В CNEVA-9066 и RA3 (группа B.Br.CNEVA), группы B.Br.001/002 и штамма Zimbabwe 89 группы B.Br.Kruger В, а также у штамма линии С ген соответствует референсному. Штамм Kruger В (группа B.Br.Kruger В) имеет мутацию со сдвигом рамки считывания, а *B. cereus biovar anthracis* CI — стоп-кодон и нефункциональные белки GerKA у обоих штаммов. *gerKB* у штаммов всех 3 линий *B. anthracis* не вариабелен, а *B. cereus biovar anthracis* CI содержит 6 синонимичных SNP, а также 2 несинонимичных SNP 181C→A(L61I) и 427G→T (V143L). *gerKC* у штаммов линий В и С не вариабелен, у штаммов линии A Vollum (canSNP группа A.Br.Vollum),

H9401 (canSNP группа A.Br.005/007) и K3 (canSNP группа A.Br.005/006) ген представлен псевдогеном из-за делеций со сдвигом рамки считывания и нарушения функции белка GerKC.

Ген *gerLA* у штаммов линий В и С не вариабелен, у штаммов линии А отмечены 3 варианта, при этом 2 варианта есть у референс-штамма Ames Ancestor, отличающиеся вставкой 1–42 GTGGGG GATTTGTTAGAGCTAAAAGGTAACCTTATTTGA AGTT (VGDLELKGNLFEV) у наиболее распространённого варианта 2. У варианта 2 стартовый редкий триплет GTG. У варианта 1 обычный стартовый триплет ATG, который имеется и у варианта 2 в положении 43–45). Тот же вариант, что и вариант 1 штамма Ames Ancestor, есть у штамма JB25 (canSNP группа A.Br.Aust94). Еще один вариант *gerLA*, имеющий делецию 1–9 и несинонимичный SNP 79G→T (D27Y), принадлежит штамму JB10 (canSNP группа A.Br.Aust94) с иницирующим триплетом TTG, у которого в положении 43–45, как и у варианта 1 штамма Ames Ancestor, есть обычный кодон ATG (рис. 2). Эти различия могут быть следствием особенностей трансляции последовательностей белков в разных сборках геномов штаммов, которые в базе данных Protein database NCBI обозначены как разные варианты GerLA. Нельзя исключить также, что в разных условиях трансляция с разной эффективностью может начинаться с разных стартовых кодонов.

Показано, что GerK и GerL демонстрируют частично перекрывающиеся герминантные специфичности, в том смысле, что они оба участвуют в аланиновом ответе, сохраняя при этом уникальные способности к распознаванию аминокислот. Анализ *in vitro* выявил индивидуальный вклад каждого рецептора герминации в известные фенотипы прорастания эндоспор *B. anthracis*. Кроме того, рецепторы герминации способны распознавать несколько соединений в определённом классе питательных веществ и, таким образом, могут рассматриваться как рецепторы молекулярного паттерна. Каждый известный путь прорастания требует по крайней мере 2 различных рецепторов. Вполне вероятно, что в совокупности эти требования к прорастанию способствуют высокой точности, с которой *B. anthracis* должен отличать почвенную среду от животного-хозяина в течение своего сложного жизненного цикла [10].

Несмотря на то что ветви А и В хорошо известны, весьма необычные изоляты ветвей С были описаны совсем недавно. Открытие ветви С позво-

1. Ames_Ancestor_var1	-----ATGAAAAAATTAGAGATGAGTTAGGTTTCGCCTAATGA
2. Ames_Ancestor_var2	GTGGGGGATTTGTTAGAGCTAAAAGGTAACCTTATTTGAAGTTATGAAAAAATTAGAGATGAGTTAGGTTTCGCCTAATGA
3. JB10	-----TTGTTTAGCGCTAAAAGGTAACCTTATTTGAAGTTATGAAAAAATTAGAGATGAGTTAGGTTTCGCCTAATGA

Рис. 2. Варианты *gerLA* штаммов *B. anthracis*.

Fig. 2. *gerLA* variants of *B. anthracis* strains.

ляет предположить, что в природе могут существовать более разнообразные генотипы *B. anthracis*, но они редко встречаются во время вспышек сибирской язвы. В противоположность этому, наиболее успешное распространение и адаптация к новым условиям окружающей среды ветви А, возможно, произошли из-за случайного глобального рассеивания или неизвестного адаптивного преимущества. Подходящий генотип может быть успешным либо из-за стохастических процессов, либо из-за фенотипических характеристик, которые создают репродуктивное преимущество. Таких биологических различий между этими группами не установлено, поскольку адаптивные фенотипы трудно различимы, но именно поэтому их нельзя исключать в качестве объяснения успеха группы. С другой стороны, считается, что темп эволюции каждой ветви может отражать адаптивные различия, такие как скорость прорастания спор, таким образом уравнивая отбор для долгосрочного выживания и эффективное размножение [18]. Линия С — самая древняя, длительность и скорость её эволюции способствовали накоплению мутаций, подверженных контрелекции. Она не обнаружена нигде, кроме США, штаммы датируются 1956 г. и после этого не выделялись. Условий для передачи возбудителя между дикими животными, которые были в изобилии в древности, было гораздо больше, чем при передаче в случае сельскохозяйственных животных в современных условиях и меньшей восприимчивости в результате вакцинации. В настоящее время в GenBank можно найти 5 геномов штаммов линии С, из которых 3 лишены плазмиды pXO1, кодирующей белки основных факторов патогенности — токсинов, что ограничивает возможности распространения этой линии. Ветвь В1 распространена в Южной Африке, где и сейчас есть большие стада восприимчивых диких копытных хозяев. Напротив, ветвь В2 встречается на юге Франции, Италии, Швейцарии, Германии, в пределах трансальпийского пояса, где хозяевами могут быть в основном одомашненные животные, исторически традиционно разводимая порода коров, с гораздо меньшими возможностями для заражения [19]. Доступность или плотность популяции хозяина могут быть движущей экологической силой, определяющей частоту передачи и, следовательно, скорость эволюции, которая для линий С и В прежде была высокой, но сейчас замедлилась. Эволюция линии А, лишенной мутаций, элиминированных в ходе селективного отбора, которая широко распространилась благодаря активности человека и вытеснила линии В и С, продолжается, способствуя успешной адаптации. Интересно отметить, что штаммы линии В, прежде встречавшиеся на Кавказе, после 1963 г. не выделялись, но сейчас вызывают вспышки сибирской язвы в азиатской части России. В частности, изоляты из вспышки 2016 г. на Ямале относились

к линии В и, как считают, активизировались из старых почвенных очагов в результате таяния вечной мерзлоты и являются древними [20, 21]

Поиск различий в генах и белках герминации спор штаммов *B. anthracis* основных генетических линий направлен на установление адаптивных фенотипов.

Таким образом, в результате проведённых исследований получены ранее не описанные в научных публикациях новые данные. Их анализ показал, что количество полиморфизмов, в том числе несинонимичных SNP в генах герминации спор, приводящих к изменению аминокислотного состава белков, у штаммов *B. anthracis* линий В, С и штамма *B. cereus biovar anthracis* было существенно больше, чем у штаммов линии А. Подобная закономерность отмечена нами также при анализе белков и генов факторов патогенности *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis* [6].

Впервые установлено, что в пределах гена *gerHA* имеются 2 области с варибельным числом tandemных повторов. В зависимости от числа повторов возможно дифференцирование как штаммов основных линий А, В и С, так и внутри линий, с привязкой к каноническим SNP-группам и некоторым конкретным штаммам. Наличие 12 SNP, включая 1 несинонимичный, в гене *gerM* штаммов линий В и С позволяет отличать их от штаммов линии А. Впервые показано, что редкие стартовые кодоны TTG, GTG, TGT и ATT встречаются у 6 генов штаммов 3 линий *B. anthracis*: *gerKB*, *gerLA*, *gerLB*, *gerPB*, *gerSB* и *gerYC*. Ген *gerLA* у штаммов линии А имеет 3 варианта, при этом у 2 из них определяется по 2 стартовых кодона, 1 из которых относится к редким TTG или GTG.

Заключение

Анализ генов и белков рецепторов герминации спор *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis* показывает, что существует их значительная варибельность как в пределах основных генетических линий, так и, особенно, между линиями. Варибельность выражалась в наличии SNP, инделов, псевдогенов и определяемых ими вариантов 25 генов и белков. Больше всего полиморфизмов у штаммов наиболее распространённой линии А. Гораздо больше их у штаммов линий В и С. Максимум полиморфизмов отмечен для *B. cereus biovar anthracis*, что вполне объясняется его в определённом смысле двойственной природой — хромосомными генами, свойственными *B. cereus*, и плазмидными, гомологичными *B. anthracis*. Учитывая, что только один оперон рецепторов прорастания *gerX* локализуется на плазмиде pXO1 и её варианте pCI-XO1 *B. cereus biovar anthracis str CI*, не удивительны фундаментальные отличия большинства генов прорастания спор у этого вида. Кроме того, ген *gerXC*, считающийся также

геном вирулентности, у *B. cereus biovar anthracis* и штаммов *B. anthracis* линии С является псевдогеном, что может влиять на функции как прорастания спор, так и вирулентности.

Значимых замен в генах рецепторов герминации спор, приводящих к изменению аминокислотного состава белков, также значительно больше у штаммов *B. anthracis* основных генетических линий В, С и *B. cereus biovar anthracis*. Подобная закономерность, отмеченная нами также при анализе белков и генов факторов патогенности *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis*, может дополнительно свидетельствовать об ограниченных адаптационных возможностях линий В и С и быть одним из объяснений их меньшей распространённости по сравнению с линией А.

Идентифицированы неописанные VNTR в пределах гена *gerHA* с единицей повтора 78 и 117 п.н. и SNP в гене *gerM*, варьирующие между и внутри изолятов разных генетических линий. Найдены различия в генах *gerHA* и *gerM*, не описанные ранее в научных публикациях, позволяющие дифференцировать основные генетические линии В и С от линии А. Показано, что 6 генов рецепторов герминации имеют редкие стартовые кодоны *TTG*, *GTG*, *TGT* и *ATT*.

Полученные в результате работы данные дополняют сведения о реализации первого этапа жизненного цикла — прорастания спор, расширяя представление об эволюции этого патогена. Они могут быть использованы для определения происхождения штаммов, вызвавших вспышки сибирской язвы, в ходе эпидемиологического расследования. Продолжением данных исследований может быть изучение вариативности генов споруляции, ещё одной важной стадии жизненного цикла возбудителя сибирской язвы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007;2(5):e461. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>
- Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., et al. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio*. 2016;7(5):e01501-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01501-16>
- Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018;64:115–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.024>
- Leendertz F.H., Ellerbrok H., Boesch C., et al. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature*. 2004;430(6998):451–2. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02722>
- Klee S.R., Brzuszkiewicz E.B., Nattermann H., et al. The genome of a bacillus isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One*. 2010;5(7):e10986. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010986>
- Еременко Е.И., Печковский Г.А., Рязанова А.Г. и др. Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):155–65. Eremenko E.I., Pechkovskiy G.A., Ryazanova A.G., et al. *In silico* analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(3):155–65. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-385> EDN: <https://elibrary.ru/ocpnux>
- Carr K.A., Lybarger S.R., Anderson E.C., et al. The role of *Bacillus anthracis* germinant receptors in germination and virulence. *Mol. Microbiol.* 2010;75(2):365–75. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06972.x>
- Ireland J.A.W., Hanna P.C. Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* DeltaSterne endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures. *J. Bacteriol.* 2002;184(5):1296–303. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.184.5.1296-1303.2002>
- Weiner M.A., Read T.D., Hanna P.C. Identification and characterization of the gerH operon of *Bacillus anthracis* endospores: a differential role for purine nucleosides in germination. *J. Bacteriol.* 2003;185(4):1462–4. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.185.4.1462-1464.2003>
- Fisher N., Hanna P. Characterization of *Bacillus anthracis* germinant receptors *in vitro*. *J. Bacteriol.* 2005;187(23):8055–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8055-8062.2005>
- Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А. Прорастание спор возбудителя сибирской язвы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2006;(1):72–4. Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Ryazanova A.G., Tsygankova E.A. Germination of *Bacillus anthracis* spores. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2006;83(1):72–4. EDN: <https://elibrary.ru/jumukx>
- Moir A. Spore germination receptors — a new paradigm. *Trends Microbiology*. 2023;31(8):767–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.05.012>
- Setlow B., Melly E., Setlow P. Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage in spore germination. *J. Bacteriol.* 2001;183(16):4894–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4894-4899.2001>
- Guidi-Rontani C., Pereira Y., Ruffie S., et al. Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXOI of *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 1999;33(2):407–14. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01485.x>
- Sirard J.C., Guidi-Rontani C., Fouet A., Mock M. Characterization of a plasmid region involved in *Bacillus anthracis* toxin production and pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000;290(4-5):313–6. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1438-4221\(00\)80030-2](https://doi.org/10.1016/s1438-4221(00)80030-2)
- Carr K.A., Janes B.K., Hanna P.C. Role of the gerP operon in germination and outgrowth of *Bacillus anthracis* spores. *PLoS One*. 2010;5(2):e9128. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009128>
- Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В. и др. Новые генетические маркеры для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(3):43–50. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., et al. New genetic markers for molecular typing of *Bacillus anthracis* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(3):43–50. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-43-50> EDN: <https://elibrary.ru/pgefkd>
- Pearson T., Busch J.D., Ravel J., et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004;101(37):13536–41. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0403844101>

19. Derzelle S., Aguilar-Bultet L., Frey J. Whole genome SNP analysis of bovine *B. anthracis* strains from Switzerland reflects strict regional separation of Simmental and Swiss Brown breeds in the past. *Vet. Microbiol.* 2016;196:1–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.014>
20. Eremenko E., Pechkovskii G., Pisarenko S., et al. Phylogenetics of *Bacillus anthracis* isolates from Russia and bordering

- countries. *Infect. Genet. Evol.* 2021;92:104890.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104890>
21. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., et al. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. *PLoS One.* 2019;14(5):e0209140.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209140>

Информация об авторах

Еременко Евгений Иванович[✉] — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, ejer@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>

Рязанова Алла Геннадиевна — к.м.н., зав. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Печковский Григорий Александрович — м.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Писаренко Сергей Владимирович — к.х.н., в.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Ковалев Дмитрий Анатольевич — к.х.н., зав. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Аксенова Людмила Юрьевна — к.м.н., с.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Семенова Ольга Викторовна — к.б.н., н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Куличенко Александр Николаевич — академик РАН, д.м.н., профессор, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Вклад авторов: Еременко Е.И. — разработка концепции исследования, анализ данных, написание текста, работа с редакцией журнала; Рязанова А.Г. — дизайн исследования, редактирование текста; Печковский Г.А. — методика и биоинформатическая обработка; Писаренко С.В. — дизайн статьи, анализ данных; Ковалев Д.А. — разработка концепции статьи; Аксенова Л.Ю. — анализ данных, подготовка текста статьи; Семенова О.В. — геномный анализ *in silico*; Куличенко А.Н. — концепция исследования, редактирование текста. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальный вариант до опубликования.

Статья поступила в редакцию 11.01.2024;
принята к публикации 23.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Evgeny I. Eremenko[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., chief scientist, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, ejer@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>

Alla G. Ryazanova — Cand. Sci. (Med.), Head, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Grigori A. Pechkovskii — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Sergey V. Pisarenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Dmitry A. Kovalev — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Lyudmila Yu. Aksenova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Olga V. Semenova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Alexander N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Author contribution. Eremenko E.I. — development of the research concept, data analysis, writing the text, working with the editorial board of the journal; Ryazanova A.G. — research design, text editing; Pechkovskiy G.A. — methodology and bioinformatics processing; Pisarenko S.V. — article design, data analysis; Kovalev D.A. — development of the concept of the article; Aksenova L.Yu. — data analysis, preparation of the text of the article; Semenova O.V. — genomic analysis *in silico*; Kulichenko A.N. — research concept, text 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 11.01.2024;
accepted for publication 23.03.2024;
published 29.04.2024

НАУКА И ПРАКТИКА

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-415>



Оценка возможности применения иммуномодулирующих лекарственных препаратов для экстренной профилактики экспериментальной чумы, вызванной вирулентным штаммом основного подвида *Yersinia pestis*

Гончарова А.Ю.[✉], Бугоркова С.А., Кислицина Е.В., Германчук В.Г.

Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Иммуномодулирующие лекарственные препараты (ИЛП) обладают большим потенциалом для повышения неспецифической реактивности организма в комплексе мероприятий по экстренной профилактике (ЭП) особо опасных инфекций, в частности чумы. В качестве перспективных для исследования ИЛП отобраны препараты последнего поколения из групп высоко- и низкомолекулярных синтетических пептидов, тиопозитиновых препаратов и цитокинов.

Цель работы — оценить протективную эффективность применения ИЛП разных групп в экспериментах по моделированию заражения высоковирулентным штаммом чумного микроба на 2 видах биомоделей.

Материалы и методы. ИЛП (рекомбинантный интерферон- γ (рИФН- γ), азоксимера бромид (ПО), синтетические иммуномодулирующие олигопептиды O1, O2, O3) вводили белым мышам и морским свинкам подкожно по схеме: за 3 дня — 1 день — 1 ч до заражения вирулентным тест-штаммом чумы *Yersinia pestis* 231(708) в дозах от 1 до 625 КОЕ. Дополнительно перед заражением у белых мышей исследовали влияние ИЛП на продукцию цитокинов ИФН- γ и интерлейкина-10.

Результаты и обсуждение. Изучение влияния ИЛП на выживаемость невакцинированных биомоделей позволило установить, что только рИФН- γ и ПО увеличивают на 20–50% выживаемость двух типов лабораторных животных и значительно повышают значение ЛД₅₀. Однако все тестируемые ИЛП способствуют увеличению средней продолжительности жизни биомоделей не менее чем на 1 сут. После трёхкратного введения ИЛП белым мышам установлено увеличение спонтанной и митогениндуцированной продукции цитокинов только у белых мышей, получивших рИФН- γ и ПО, что коррелирует с показателями выживаемости животных.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения ИЛП, особенно рИФН- γ и ПО, при защите макроорганизма от заражения *Y. pestis*, что определяет перспективность исследований по дальнейшему совершенствованию схем ЭП чумы. Цитокин ИФН- γ может служить маркером протективной эффективности ИЛП.

Ключевые слова: чума, иммуномодуляторы, выживаемость, экстренная профилактика

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 Российского противочумного института «Микроб» (протоколы № 11 от 16.10.2019; № 3 от 05.03.2020; № 14 от 19.09.2022).

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

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

Для цитирования: Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кислицина Е.В., Германчук В.Г. Оценка возможности применения иммуномодулирующих лекарственных препаратов для экстренной профилактики экспериментальной чумы, вызванной вирулентным штаммом основного подвида *Yersinia pestis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2024;101(2):248–258.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-415>

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

Assessment of the effect of using immunomodulatory drugs for emergency prevention of experimental plague caused by a virulent strain of the main subspecies *Yersinia pestis*

Anastasiya Yu. Goncharova[✉], Svetlana A. Bugorkova, Ekaterina V. Kislitsina, Valery G. Germanchuk

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

Abstract

Introduction. Immunomodulatory drugs (IMD) have great potential to increase the nonspecific reactivity of the organism in a set of measures for emergency prevention of plague. The purpose of the work is to evaluate the protective effectiveness of the use of IMD of different groups in experiments on modeling infection with a highly virulent strain of the plague microbe.

Materials and methods. IMD (rIFN- γ — recombinant interferon-gamma, PO — azoximer bromide, synthetic immunomodulatory oligopeptides O1, O2, O3) was administered to white mice and guinea pigs subcutaneously thrice by the schedule 3 days, 1 day, and 1 hour prior the infection with a virulent test strain of plague *Yersinia pestis* 231 (708) at dose from 1 to 625 CFU. In addition, the effect of IMD on the production of IFN- γ and interleukin-10 was investigated in white mice before infection.

Results. The study of the effect of IMD on the survival of unvaccinated biomodels made it possible to establish that only rIFN- γ and PO increase the survival of two types of laboratory animals by 20–50% and significantly increase the LD₅₀. All tested IMD contribute to an increase in the average life expectancy of biomodels by at least one day. An increase in spontaneous and mitogen-induced cytokine production was found only in white mice receiving rIFN- γ and PO, which correlates with animal survival rates.

Conclusion. The obtained data indicate the effectiveness of the use of IMD, especially rIFN- γ and PO in protecting the macroorganisms from infection with *Y. pestis*, which determines the prospects for research on the further improvement of emergency prevention of plague.

Keywords: *plague, immunomodulators, survival, emergency prevention*

Ethical statement. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23.07.2010). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Anti-Plague Institute "Microbe" (protocols No. 11, October 16, 2019; No. 3, March 5, 2020; No. 14, September 19, 2022).

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

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

For citation: Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kislitsina E.V., Germanchuk V.G. Assessment of the effect of using immunomodulatory drugs for emergency prevention of experimental plague caused by a virulent strain of the main subspecies *Yersinia pestis*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):248–258.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-415>

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

Введение

Чума — острое природно-очаговое инфекционное заболевание из группы карантинных инфекций, протекающее с исключительно тяжёлым общим состоянием, часто с развитием сепсиса. Коэффициент летальности бубонной чумы достигает 30–60%, а лёгочная чума при отсутствии лечения практически всегда приводит к летальному исходу. Широкое распространение природных очагов чумы и сохранение напряжённой эпизоотологической обстановки на отдельных территориях России, актуальная

угроза биотерроризма, продолжающиеся разработки биологического оружия и другие факторы риска возникновения эпидемических проявлений этого особо опасного заболевания обуславливают необходимость совершенствования существующих и разработку новых средств и схем специфической и экстренной профилактики (ЭП) чумы.

В комплексе мер как общей, так и специальной ЭП чумы по распоряжениям исполнительных органов власти России всем лицам, подвергшимся заражению или угрозе инфицирования, назначают

ся антибиотики и химиопрепараты широкого спектра действия: рифампицин, доксицилин, офлоксацин, пefлоксацин, ципрофлоксацин, а также их сочетания, позволяющие получить синергидный эффект (аминогликозиды с рифампицином или бета-лактамами; рифампицин с бета-лактамами; фторхинолоны с бета-лактамами и аминогликозидами) [1, 2]. Совершенствование ЭП чумы ведётся по нескольким направлениям: поиск новых высокоэффективных лекарственных антимикробных средств; разработка схем совместного применения экстренной антибактериальной превентивной терапии и специфической вакцинопрофилактики, что, по мнению многих исследователей, является наиболее действенным мероприятием при угрозе антропогенного распространения чумы [3]; оценка возможности применения современных иммуноадьювантов и иммуномодуляторов [4]. Каждый из этих подходов не лишён некоторых недостатков. При расширении перечня доступных антибактериальных препаратов для целей ЭП существует угроза риска появления антибиотикоустойчивых вирулентных штаммов, что является серьёзной проблемой здравоохранения [5]. Применение экстренной иммунизации живой чумной вакциной (ВЧЖ) на фоне проведения постконтактной этиотропной химиопрофилактики приводит к угнетению процесса формирования поствакцинального и постинфекционного иммунитета [6, 7]. Попытки использования для ЭП вакцины на основе антибиотикорезистентных штаммов чумного микроба сопряжены с высоким риском передачи признаков антибиотикорезистентности в процессе персистенции вакцинного штамма в организме привитых людей как патогенным, так и условно-патогенным микроорганизмам [8].

В этой связи исследование эффективности применения лекарственных препаратов, обладающих доказанным иммуномодулирующим потенциалом, с целью повышения неспецифической резистентности организма для профилактики и лечения инфекционных заболеваний стало активно развивающимся в последнее время направлением. Иммуномодулирующая терапия, по мнению многих авторов, обладает рядом преимуществ перед традиционным антимикробным лечением: не вызывает развития множественной лекарственной устойчивости среди микроорганизмов, позволяет значительно расширить подходы к лечению пациентов с иммунными расстройствами, может использоваться в качестве неспецифической неотложной терапии и профилактики в экстренных ситуациях [9]. В соответствии с основными требованиями, предъявляемыми к иммуномодулирующим лекарственным препаратам (ИЛП), используемым для ЭП инфекционных болезней, они должны обладать следующими характеристиками:

1. Обладать широким спектром активирующего влияния на иммунитет (как Т-, так и В-клеточное звено), иметь критерии (маркеры) оценки эффективности действия.
2. Быть безопасными, не иметь противопоказаний, не вызывать привыкания, побочных реакций, аллергических и канцерогенных эффектов.
3. Должны быть доступны для массового применения, быть зарегистрированы как лекарственное средство и произведены в России.
4. Обладать высокой совместимостью с вакцинными препаратами, а также антибиотико- и химиопрепаратами, повышая их эффективность и снижая терапевтическую дозу при совместном введении.

В той или иной степени данным критериям соответствуют ИЛП, используемые в исследованиях по совершенствованию ЭП сибирской язвы (ликопид, бактистатин) [7], туляремии (препарат цитокина интерлейкина (ИЛ)-12, имунофан) [10], сапа и миелоидоза (интерферон гамма (ИФН- γ), глутоксим, бестим, имунофан) [11, 12], холеры (ликопид, имунофан, полиоксидоний) [13], чумы (полиоксидоний, цитозин-гуанин олигодезоксинуклеотиды — СрG-ОДН) [14, 15].

Среди нескольких десятков ИЛП, различающихся как по химической структуре, так и по механизму действия, на основании данных литературы и ранее проведённых нами исследований [4, 16, 17] в качестве перспективных для применения в комплексе мероприятий по ЭП чумы были отобраны современные коммерческие ИЛП из групп тиопозитиновых препаратов (глутамил-цистеинил-глицин динатрия — О1), синтетических пептидов (треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат — О2; аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин — О3), цитокинов (рекомбинантный интерферон-гамма — рИФН- γ), а также синтетический высокомолекулярный полиэлектролит — азоксимера бромид (ПО). Все использованные ИЛП — российский производства, разрешены к применению у взрослых и детей с 2–3 лет, обладают наряду с иммуномодулирующим, детоксицирующим (ПО, О3), гепатопротективным (О1, рИФН- γ , О3), антиоксидантным (ПО, О3), антибиотикопотенцирующим (ПО, О1) действием. Ранее нами была доказана безвредность всех испытуемых ИЛП при совместном использовании с ВЧЖ в гисто- и патоморфологическом исследовании на морских свинках, а также эффективное снижение средней иммунизирующей дозы вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ (ImD₅₀) [4, 16, 17].

Цель данной работы — оценить протективную эффективность применения ИЛП разных групп в

экспериментах по моделированию заражения высоковирулентным штаммом чумного микроба на 2 видах биомоделей.

Материалы и методы

Штаммы

В работе использовали вирулентный штамм *Y. pestis* 231(708) основного подвида, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора.

Иммунomodулирующие препараты

Дозы препаратов — О1 («Фарма Вам»), О2 («Иммафарма»), О3 («Бионокс НПП»), ПО («НПО Петровакс Фарм»), человеческий рИФН-γ («Фармаклон») — для введения биомоделям выбраны, исходя из рекомендуемой производителями дозы для человека с учётом перерасчёта на массу тела животного (табл. 1).

Лабораторные животные

Эксперименты проводили на беспородных белых мышах массой $21,5 \pm 3,5$ г и на морских свинках массой 375 ± 75 г, полученных из питомника Российского противочумного института «Микроб». Эти виды чаще всего используются в исследованиях по заражению возбудителем чумы и предусмотрены нормативными документами к применению для оценки протективных свойств вакцин и схем их введения. Манипуляции с животными, а также выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» и «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протоколы исследований одобрены Комиссией по биоэтике при Российском противочумном институте «Микроб» Роспотребнадзора (протоколы № 11 от 16.10.2019; № 3 от 05.03.2020; № 14 от 19.09.2022).

Питательные среды

Культуры штаммов выращивали на агаре Хоттингера рН $7,2 \pm 0,1$ (производство Российского противочумного института «Микроб»).

Оценка протективности

Животным (беспородные белые мыши, морские свинки) опытных групп вводили исследуемые ИЛП подкожно в дозах, указанных в табл. 1, трехкратно по схеме: за 3 дня — 1 день — 1 ч до заражения вирулентным тест-штаммом чумы *Y. pestis* 231(708). В контрольную группу входили интактные лабораторные мыши и морские свинки, которым подкожно вводили физиологический раствор в объёме 0,2 и 0,5 мл соответственно. Заражение животных опытных и контрольной групп осуществляли тест-штаммом *Y. pestis* 231(708) в пятикратно возрастающей концентрации от 1 до 625 КОЕ. Наблюдение за животными проводили в течение 15 дней, в конце эксперимента всех выживших животных умерщвляли с помощью паров хлороформа. Гибель биомодели от чумы подтверждали наличием характерных для чумной инфекции патологоанатомических изменений; чумного микроба в мазках-отпечатках из органов павших животных, окрашенных по Граму; положительного результата высевов из органов и крови на пластинки агара Хоттингера рН ($7,2 \pm 0,1$), содержащие стимулятор роста сульфит натрия ($0,024 \pm 0,001\%$) и генцианвиолет ($0,0045 \pm 0,0005\%$).

У животных определяли показатели выживаемости (процентное соотношение выживших на конец эксперимента животных к общему количеству взятых в эксперимент животных данной группы), среднюю продолжительность жизни павших в эксперименте животных, длительность инкубационного периода до начала манифестации заболевания, среднюю смертельную/летальную дозу (LD_{50} — статистически установленную дозу, которая при однократном введении вызывает гибель 50% взятых в эксперимент животных) заражающего тест-штамма чумы и индекс иммунитета (ИИ) — отношение величины LD_{50} для животных опытной группы к величине LD_{50} для животных контрольной группы.

Таблица 1. Препараты, использованные для иммунизации биопробных животных

Table 1. Preparations used for immunization of bioassay animals

Препарат, использованный для иммунизации The preparation used for immunization	Иммунизация беспородных белых мышей Immunization of outbred white mice		Иммунизация беспородных морских свинок Immunization of outbred guinea pigs	
	доза dose	n	доза dose	n
О1, мкг µg	40	64	400	24
О2, мкг µg	30	70	300	20
О3, мкг µg	1	72	10	20
ПО, мкг PO, µg	4	64	50	32
рИФН-γ, МЕ rIFN-γ, IU	150	64	2000	32

Учитывали процент обсеменения чумным микробом внутренних органов павших и выживших биопробных животных.

Цитокиновый профиль

Продукцию цитокинов — ИФН- γ и ИЛ-10 — в клеточных культурах крови мышей определяли перед заражением на 3-и сутки после начала введения ИЛП с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с применением коммерческих тест-систем («Abscam», «BioScience») на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Lazurit» («Dynex Technologies») при длине волны 450 нм. Для этого венозную кровь с антикоагулянтом (гепарин, «Синтез») разводили в соотношении 1 : 4 средой RPMI-1640 («PanEco»), содержащей 100 мкг/мл гентамицина («Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко»), затем делили на две равные части. В одну часть вносили 100 мкл стандартного

T-клеточного митогена конканавалина А («Sigma») в конечной концентрации 15 мкг/мл (индуцированная продукция), в другую — 100 мкл физиологического раствора (спонтанная продукция). Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 ч при 37°C. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в стандартных условиях и отбирали супернатанты.

Статистические методы

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2010» и «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью корреляционно-регрессионного анализа (коэффициент корреляции Пирсона). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента и W-критерия Вилкок-

Таблица 2. Влияние ИЛП на выживаемость биопробных животных при подкожном заражении вирулентным тест-штаммом *Y. pestis* 231

Table 2. The effect of immunomodulatory drugs on the survival of bioassay animals during subcutaneous infection with a virulent test strain *Y. pestis* 231

Иммунизирующий препарат Immunizing medication	Биомодель Biomodel	Доза <i>Y. pestis</i> 231, LD ₅₀ Dose of <i>Y. pestis</i> 231, LD ₅₀	Число животных (выжившие/общее количество) Number of animals (survived/inoculated)	Средняя продолжительность жизни, сут Mean time-to-death, days <i>M</i> ± <i>m</i>	ЛД ₅₀ , КОЕ LD ₅₀ , CFU	ИИ Immunity index
Физиологический раствор PBS	Белая мышь White mice	5	2/10	3,7 ± 0,5	5	–
		25	0/10	3,5 ± 0,2		
	Морская свинка Guinea pigs	5	0/5	4,9 ± 0,7		
		25	0/10	4,6 ± 0,6		
pИФН- γ rIFN- γ	Белая мышь White mice	5	3/9	7,5 ± 0,4*	12	2,4
		25	1/8	6,2 ± 0,3*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	2/6	6,5 ± 0,8*		
		25	1/10	6,1 ± 0,4		
ПО PO	Белая мышь White mice	5	5/8	7,3 ± 0,4*	20	4
		25	2/8	6,4 ± 0,8*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	3/6	7,5 ± 0,3*		
		25	2/6	7,2 ± 0,4*		
O1	Белая мышь White mice	5	5/8	6,0 ± 0,7*	16	3,2
		25	2/8	5,4 ± 0,4*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	2/6	6,9 ± 0,4*		
		25	0/6	7,5 ± 0,8*		
O2	Белая мышь White mice	5	2/10	6,6 ± 2,2*	5	1
		25	0/8	5,2 ± 0,9*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	0/5	7,2 ± 1,6		
		25	0/5	6,4 ± 0,4*		
O3	Белая мышь White mice	5	3/9	7,5 ± 0,3*	9	1,8
		25	1/10	6,8 ± 0,6*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	1/5	6,6 ± 0,6*		
		25	0/5	6,3 ± 0,6*		

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note. * $p < 0.05$ compared to the control group.

сона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Ранее было установлено, что однократное введение всех исследуемых ИЛП непосредственно перед заражением высоковирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (708) не влияет на развитие патологического процесса, показатели выживаемости и среднюю продолжительность жизни лабораторных животных [4, 17, 18]. Экспериментально подтверждено, что для положительного эффекта необходимо минимум трёхкратное введение препарата, например, по схеме: за 3 дня — 1 день — 1 ч перед

заражением. В данном исследовании в условиях моделирования бубонной формы чумной инфекции стояла задача оценить эффективность отработанной ранее схемы экстренного применения различных групп ИЛП, различающихся по механизму действия.

Установлено, что трёхкратное применение ИЛП до заражения белых мышей приводит к увеличению ЛД₅₀ и ИИ во всех опытных группах, кроме животных, иммунизированных О2 (табл. 2). Выживаемость белых мышей, иммунизированных рИФН-γ, ПО, О1 и О3, составила в среднем 36, 59, 50 и 26% соответственно. При заражающей дозе 25–30 ЛД₅₀ *Y. pestis* 231 выживаемость снижалась

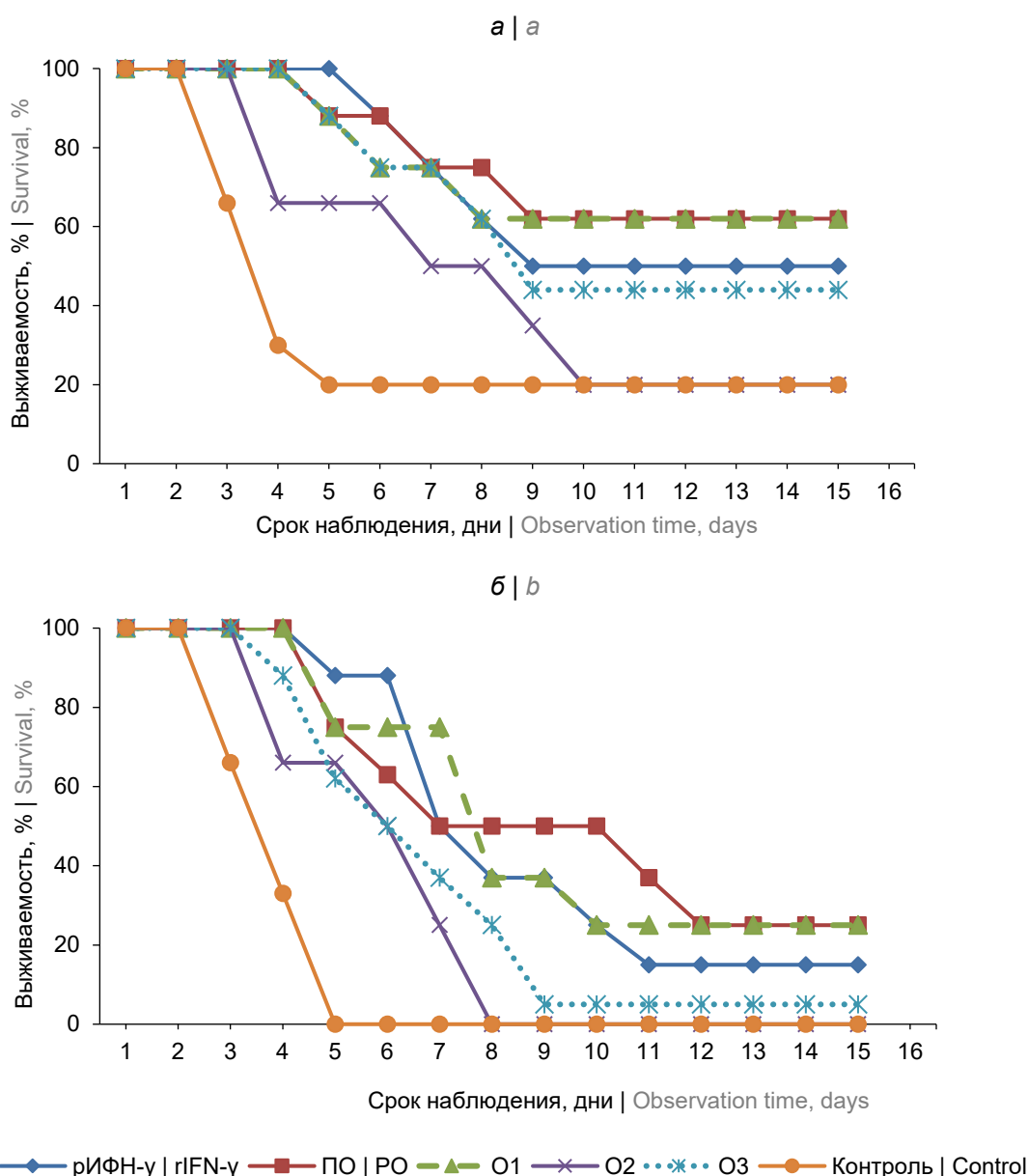


Рис. 1. Влияние ИЛП на продолжительность жизни белых мышей в условиях подкожного заражения 5 ЛД₅₀ (а) и 25 ЛД₅₀ (б) *Y. pestis* 231.

Fig. 1. The effect of immunomodulators on survival of white mice after subcutaneous challenge with 5 LD₅₀ (a) and 25 LD₅₀ (b) *Y. pestis* strain 231.

до 0–5%, кроме групп, иммунизированных рИФН- γ (15%), О1 и ПО (по 25%) (рис. 1).

Во всех опытных группах отмечено увеличение средней продолжительности жизни павших животных, в большей степени у мышей, иммунизированных рИФН- γ , ПО и О3, на 24–96 ч в зависимости от типа биомодели и инфицирующей дозы вирулентного штамма (табл. 2). При применении рИФН- γ , ПО и О1 зарегистрировано пролонгирование инкубационного периода до начала заболевания у павших животных в среднем на 24–48 ч.

Достоверное увеличение ($p < 0,05$) показателей выживаемости и ИИ в опытах с морскими свинками зарегистрировано только при применении рИФН- γ и ПО (рис. 2). Выживаемость морских свинок в этих группах составила в среднем 22 и 36% соответственно. Влияние ИЛП на среднюю продолжительность жизни и инкубационный период отмече-

но во всех опытных группах, но в большей степени при применении ПО, О1 и О2.

Выжившие животные были забиты на 15-е сутки после заражения, из селезёнки и печени всех павших, а также 5 (8,6%) из 58 выживших белых мышей и 1 (3,8%) из 26 выживших морских свинок выделена культура заражающего штамма *Y. pestis* 231. Обсеменение внутренних органов зарегистрировано у животных, получивших максимальную заражающую дозу *Y. pestis* 231: 125 КОЕ — белые мыши и 625 КОЕ — морские свинки. У оставшихся в живых животных группы, иммунизированной ПО, культура *Y. pestis* 231 выделена не была.

У белых мышей как контрольной, так и опытных групп перед заражением проводили забор крови и определение биомаркерных для характеристики противочумного иммунного ответа цитокинов — ИФН- γ и ИЛ-10 [19]. По данным имму-

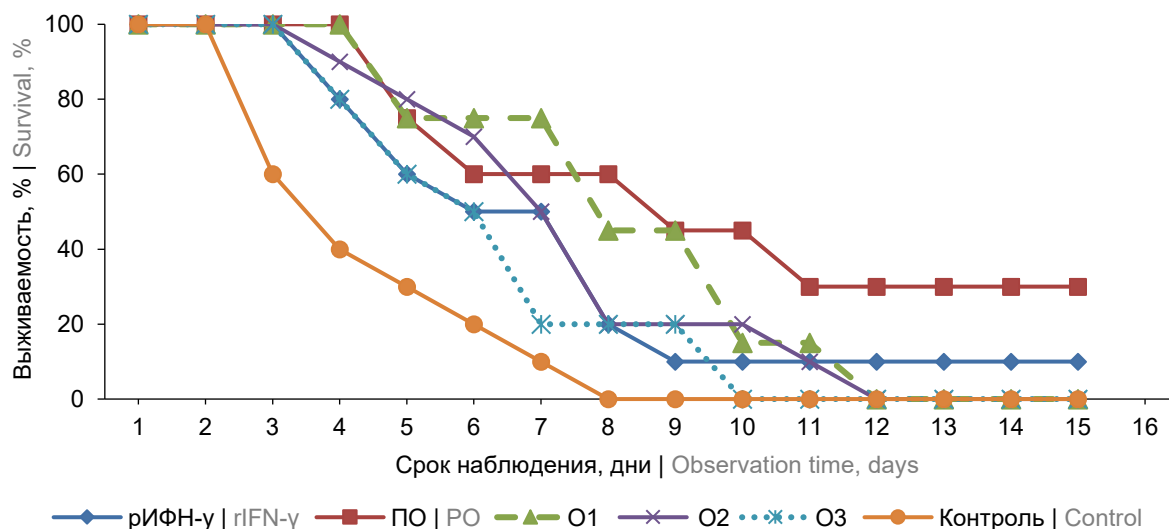


Рис. 2. Влияние ИЛП на продолжительность жизни морских свинок в условиях подкожного заражения 25 ЛД₅₀ *Y. pestis* 231.

Fig. 2. The effect of immunomodulators on survival of guinea pigs after subcutaneous challenge with 25 LD₅₀ *Y. pestis* strain 231.

Таблица 3. Влияние трёхкратного введения ИЛП на уровень цитокинов у иммунизированных белых мышей Ме (Q₁–Q₃)
Table 3. The effect of three-time administration of immunomodulatory drugs on the level of cytokines in immunized white mice Me (Q₁–Q₃)

Иммунизирующий препарат Immunizing medication	ИФН- γ , пг/мл IFN- γ , pg/ml		ИЛ-10, пг/мл IL-10, pg/ml	
	спонтанная продукция spontaneous production	митоген-индуцированная продукция induced production	спонтанная продукция spontaneous production	митоген-индуцированная продукция induced production
Физиологический раствор PBS	20,2 (14,0–26,2)	32,6 (23,5–41,7)	9,8 (7,6–12,2)	11,6 (10,8–12,5)
рИФН- γ rIFN- γ	60,2* (42,2–68,7)	96,7* (70,5–107,0)	51,1* (44,4–63,1)	55,6* (48,9–74,0)
ПО PO	52,1* (32,4–64,5)	60,3* (56,4–71,0)	17,7* (13,8–19,3)	22,3* (18,5–24,2)
O1	25,2 (12,2–38,7)	56,7* (44,5–77,0)	11,1 (4,4–23,1)	25,6* (18,9–44,0)
O2	26,0 (18,0–34,2)	39,6 (29,4–47,6)	14,5 (8,6–23,3)	19,4 (8,6–36,8)
O3	27,1 (20,2–34,1)	54,5* (49,5–71,0)	17,7* (14,0–19,8)	22,9* (19,6–24,7)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note. * $p < 0.05$ compared to the control group.

ноферментного анализа установлено увеличение спонтанной и митоген-индуцированной продукции исследуемых цитокинов при применении рИФН-γ и ПО (табл. 3). Применение О1 и О3 влияло только на митоген-индуцированную продукцию указанных цитокинов. У мышей, иммунизированных О2, значения ИФН-γ и ИЛ-10 в крови регистрировали на уровне контрольных показателей. Выявлена высокая корреляционная зависимость между показателем выживаемости животных и уровнем митоген-индуцированной продукции ИФН-γ ($r = 0,94$; $p = 0,038$). Установлена корреляционная связь между показателями выживаемости белых мышей и уровнем митоген-индуцированной продукции ИЛ-10 ($r = 0,8$; $p = 0,078$), однако связь эта не была достоверной.

Обсуждение

Применение ИЛП как важная составляющая ЭП инфекций помогает решить ряд задач: преодоление разнообразных побочных эффектов от массивной антибиотикотерапии и снижение дозы назначаемых химиопрепаратов; коррекция первичных и вторичных иммунодефицитных состояний; усиление иммунного ответа при помощи индукции неспецифических и специфических факторов иммунитета; потенцирование действия вакцинных препаратов; удлинение инкубационного периода до развития манифестации заболевания [7, 9]. Последнее обстоятельство особенно важно при чумной инфекции, т.к. важнейшими условиями выживания пациентов и профилактики осложнений после заражения являются быстрая диагностика и раннее начало лечения до развития генерализации инфекционного процесса. Несвоевременное назначение антибактериальных препаратов, с одной стороны, резко повышает риск развития летального исхода [20], а с другой — может привести к появлению антибиотикорезистентных штаммов возбудителя чумы [5]. Включение в схемы и методы ЭП чумы препаратов, обладающих иммунотропными свойствами, позволяет, во-первых, корректировать фоновое состояние неспецифической резистентности, что во многом определяет развитие и исход любого инфекционного процесса [7], а во-вторых, активировать как гуморальное, так и клеточное звено иммунной системы, что способствует предотвращению инфекции и/или снижению риска развития тяжёлого течения болезни.

При моделировании экспериментальной чумы установлено, что все тестируемые ИЛП обеспечивают увеличение средней продолжительности жизни биомоделей не менее чем на сутки. Данный эффект очень важен в лечебной практике, т.к. дополнительные 24 ч на принятие решения о назначении этиотропной терапии позволяют минимум на 50% повысить шансы на выздоровление

пациента [21, 22]. Кроме того, применение ИЛП создаёт резерв времени для замены неэффективного или малоэффективного антибактериального препарата, назначенного в рамках общей ЭП, на высокоэффективный химиопрепарат по результатам определения антибиотикочувствительности выделенной культуры *Y. pestis*.

Нами установлено, что применение рИФН-γ и ПО повышает на 20–50% выживаемость лабораторных животных — как мышей, так и морских свинок — и влияет на увеличение ИИ не менее чем в 2 раза, что является очень обнадеживающим результатом для ЭП особо опасного заболевания. Так, в схемах ЭП мелиоидоза использование олигопептидного иммуномодулятора О3 также приводило к 20% повышению выживаемости экспериментальных животных [11], а применение Т.А. Бондаревой и соавт. иммуномодулятора ПО совместно с антибиотиками при ЭП чумы повышало выживаемость на 26–60%, увеличивая среднюю продолжительность жизни белых мышей [14]. Немаловажным фактом было то, что применение иммуномодулятора ПО предотвращало не только гибель заражённых белых мышей и морских свинок, но и обсеменение их внутренних органов *Y. pestis*, что согласуется с ранее полученными Б.В. Каральник и соавт. данными о влиянии ПО на иммуногенную и протективную активность ВЧЖ [23].

Исследование биомаркерных для чумной инфекции цитокинов — ИФН-γ и ИЛ-10 — позволяет определить реактивность клеток иммунной системы и их готовность к реагированию на патоген [24]. После трёхкратного введения ИЛП белым мышам установлено увеличение спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов, особенно у животных, получавших рИФН-γ и ПО. Наши данные по оценке корреляционной связи между уровнем ИФН-γ и долей выживших животных, значениями LD_{50} и ИИ соотносятся с ранее полученными [19] информативными коррелятами защиты как мышей, так и привитых людей от чумы. Повышение индуцированной продукции ИФН-γ можно использовать в качестве адекватного маркера протективной эффективности иммунизации ИЛП, как и ВЧЖ.

В выборе ИЛП для лечения и профилактики инфекционных заболеваний важно учитывать механизм и направленность действия иммуномодулятора на структуру иммунной системы [25]. Несмотря на то что иммунофармакология развивается в направлении разработки препаратов, избирательно действующих на различные звенья иммунной системы, при чумной инфекции большую эффективность продемонстрировали препараты, стимулирующие как клеточный и гуморальный иммунитет, так и неспецифическую резистентность организма. Препарат О1, относящийся к классу тиопозтинов,

и препарат ОЗ, являющийся синтетическим аналогом фрагмента гормона тимуса — тимопоэтина, в большей степени ответственны за клеточный иммунитет, что выражается в стимуляции продукции ассоциированного с Th1-клетками иммунной системы цитокина ИФН- γ . В данном исследовании эти ИЛП способствовали увеличению выживаемости и средней продолжительности жизни белых мышей, заражённых высоковирулентным штаммом чумы. Однако применение О1, О2 и О3 у морских свинок, хотя и позволило увеличить среднюю продолжительность жизни биомоделей, не способствовало повышению выживаемости экспериментальных животных. Применение ИЛП с более широким спектром воздействия на иммунную систему макроорганизма показало наибольшую эффективность для ЭП экспериментальной чумы. Так, препарат рИФН- γ на основе ключевого иммуномодулятора воспаления, запускающего каскад защитных иммунологических реакций, вызывающих активацию эффекторных функций макрофагов, нейтрофилов, естественных киллерных клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов [26], и синтетический полиэлектролит ПО, оказывающий стимулирующее действие на неспецифическую резистентность организма, активирующий все звенья фагоцитарного процесса, гуморальный и клеточный иммунный ответ, кроме того, обладающий мощным детоксицирующим действием, что используется при лечении различных септических состояний [27], не только способствовали повышению выживаемости и средней продолжительности жизни биопробных животных при их применении, но и повышали продукцию собственных цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-10), что позволяет рекомендовать включение в схемы ЭП чумы именно ИЛП широкого спектра действия.

Заключение

Полученные обнадёживающие экспериментальные результаты позволяют судить о перспективности применения ИЛП в схемах ЭП чумной инфекции. Среди большого количества разнонаправленных ИЛП при ЭП чумы предпочтительнее использовать препараты, обладающие широким спектром активирующего влияния на иммунитет, адекватным маркером эффективности их действия можно считать повышение индуцированной продукции цитокина ИФН- γ . Возможными средствами иммуномодуляции при ЭП чумы могут стать препараты рИФН- γ и ПО, однако для последующей рекомендации включения этих ИЛП в схемы ЭП чумы у людей необходимо проведение дополнительных исследований как *in vivo* (с использованием других видов биомоделей: кроликов, приматов), так и *in vitro* (для оценки динамики показателей иммунитета, у иммунизированных добровольцев).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Малеев В.В., ред. *Экстренная профилактика и лечение опасных инфекционных болезней: Методические рекомендации*. М.; 2009. Maleev V.V., ed. *Emergency Prevention and Treatment of Dangerous Infectious Diseases: Methodological Recommendations*. Moscow; 2009.
2. Щипелева И.А., Марковская Е.И. Антибиотики. Чума. Эксперимент. Опыт работы Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института: исторический обзор. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018;7(3):80–7. Shchipeleva I.A., Markovskaya E.I. Antibiotics. Plague. Experiment. Research work experience of the Rostov-on-Don anti-plague research institute (historical overview). *Infectious diseases. News, Opinions, Training*. 2018;7(3):80–7. DOI: <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13012> EDN: <https://elibrary.ru/ylhrfl>
3. Попова А.Ю., Кутырев В.В., ред. *Специфическая профилактика чумы: состояние и перспективы*. Саратов; 2021. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., eds. *Specific Prevention of the Plague: Status and Prospects*. Saratov; 2021.
4. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н. и др. Разработка экспериментальных схем экстренной профилактики чумы на основе применения рекомбинантного интерферона гамма. *Инфекционные болезни*. 2022;20(4):68–74. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., et al. Development of experimental schemes for emergency vaccination against plague using recombinant interferon- γ . *Infectious Diseases*. 2022;20(4):68–74. DOI: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-4-56-62>
5. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., et al. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerging Infect. Dis*. 2001;7(1):43–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0701.010106>
6. Byme W.R., Weikos S.L., Pitt M.L., et al. Antibiotic treatment of experimental pneumonia plaque in mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998;48(3):675–81. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.42.3.675>
7. Антонов В.А., Жукова С.И., Демьянова О.Б., Абдрахманова Р.О. Проблема экстренной профилактики инфекционных болезней. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2015;(1):24–31. Antonov V.A., Zhukova S.I., Dem'yanova O.B., Abdrakhmanova R.O. The problem of emergency prophylaxis of infectious diseases. *Volgograd Journal of Medical Research*. 2015;(1):24–31. EDN: <https://elibrary.ru/tyzabz>
8. Орлова Н.В. Антибиотикорезистентность и современная стратегия антибактериальной терапии. *Медицинский совет*. 2022;16(8):89–97. Orlova N.V. Antibiotic resistance and modern strategy of antibacterial therapy. *Medical Council*. 2022;16(8):89–97. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97> EDN: <https://elibrary.ru/cvafqb>
9. Булгакова В.А. Иммуномодуляторы для профилактики и лечения острых респираторных инфекций: эффективность азоксимера бромид. *Терапевтический архив*. 2014;86(12):92–7. Bulgakova V.A. Immunomodulators for the prevention and treatment of acute respiratory infections: efficacy of Azoximer bromide. *Terapevticheskii arkhiv*. 2014;86(12):92–7. DOI: <https://doi.org/10.17116/terarkh2014861292-97> EDN: <https://elibrary.ru/tmpmct>
10. Pammit M.A., Budhavarapu V.N., Raulie E.K., et al. Intranasal interleukin-12 treatment promotes antimicrobial clearance and survival in pulmonary *Francisella tularensis* subsp. *novicida* infection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004;48(12):4513–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.48.12.4513-4519.2004>
11. Хабарова И.А., Жукова С.И., Ротов К.А. и др. Экстренная профилактика экспериментального мелниоза с использованием синтетических иммуномодуляторов и гетерологичных вакцин. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2018;22(3):340–50.

- Khabarova I.A., Zhukova S.I., Rotov K.A., et al. Emergency prophylaxis of experimental melioidosis using synthetic immunomodulators and heterologous vaccines. *RUDN Journal of Medicine*. 2018;22(3):340–50.
DOI: <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2018-22-3-340-350>
EDN: <https://elibrary.ru/ynajxn>
12. Propst K.L., Troyer R.M., Kelliham L.M., et al. Immunotherapy markedly increases the effectiveness of antimicrobial therapy for treatment of *Burkholderia pseudomallei* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(5):1785–92.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01513-09>
13. Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омелъченко Н.Д., Труфанова А.А. Влияние иммуномодуляторов на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(1):81–92. Filippenko A.V., Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A. The influence of immunomodulators on the formation of vaccine-induced cholera immunity. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(1):81–92.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-188>
EDN: <https://elibrary.ru/shtorf>
14. Бондарева Т.А., Поярков А.Ю., Вахнов Е.Ю. Использование полиоксидония в комплексном лечении генерализованных форм экспериментальной чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009;(1):67–9. Bondareva T.A., Poyarkov A.Yu., Vakhnov E.Yu. Application of polyoxidonium in the mixed treatment of experimental plague generalized forms. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;(1):67–9.
EDN: <https://elibrary.ru/jwztsv>
15. Hickey A., Lin J., Kummer L., et al. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxy-nucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2013;81(6):2123–32.
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00316-13>
16. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М. и др. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):71–7. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., et al. Experimental evaluation of application of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG in combination with immune-modulators. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):71–7.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-71-77>
EDN: <https://elibrary.ru/fbjedk>
17. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н. Повышение иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с использованием синтетических иммуномодуляторов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(1):84–94. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N. Increasing the immunogenic and protective activity of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV LINE NIEG using synthetic immunomodulators. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(1):84–94.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-335>
EDN: <https://elibrary.ru/ipltxb>
18. Щуковская Т.Н., Курьлина А.Ф., Шавина Н.Ю., Бугоркова С.А. Влияние полиоксидония, Poly(I:C), даларгина на защитное действие вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ при экспериментальной чуме. *Российский иммунологический журнал*. 2020;23(1):41–50. Shchukovskaya T.N., Kurylina A.F., Shavina N.Yu., Bugorkova S.A. Influence of polyoxidonium, poly(i:c), dalargin on the protective efficacy of *Yersinia pestis* vaccine strain EV line NIEG in experimental plague. *Russian Journal of Immunology*. 2020;23(1):41–50.
DOI: <https://doi.org/10.46235/1028-7221-005-IOP>
EDN: <https://elibrary.ru/jewstw>
19. Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Каштанова Т.Н. Выявление коррелятов протекции от *Yersinia pestis* на мышинной модели и оценка возможности применения их в качестве маркеров эффективности вакцинации у людей. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(2):253–62. Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Kashtanova T.N. Identifying correlates of protection from *Yersinia pestis* on a mouse model and assessing an opportunity for their use as markers of human vaccination efficiency. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(2):253–62.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ICO-1734>
EDN: <https://elibrary.ru/gxukty>
20. Andersson J.A., Sha J., Kirtley M.L., et al. Combating multidrug-resistant pathogens with host-directed nonantibiotic therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 62(1):e01943-17.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01943-17>
21. Li Y., Li D., Shao H., et al. Plague in China 2014 — all sporadic case report of pneumonic plague. *BMC Infect. Dis.* 2016;16:85.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1403-8>
22. Kumar A. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy. *Virulence*. 2014;5(1):80–97.
DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.26913>
23. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н. и др. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;91(6):108–12. Karal'nik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., et al. Effect of immune modulation on immunogenic and protective activity of a live plague vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2014;91(6):108–12.
EDN: <https://elibrary.ru/tucmmt>
24. Williamson E.D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. *Adv. Prev. Med.* 2012;2012:365980.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/365980>
25. Хайтов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность. *Иммунология*. 2020;41(2):1–6. Khaitov R.M. Immunomodulators: myths and reality. *Immunologiya*. 2020;41(2):1–6.
DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106>
EDN: <https://elibrary.ru/vpicjn>
26. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004;75(2):163–89.
DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
27. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хайтов Р.М. Иммуномодулятор Полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление*. 2004;3(3):41–7. Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Khaitov R.M. Immunomodulator Polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical application. *Cytokines and Inflammation*. 2004;3(3):41–7.
EDN: <https://elibrary.ru/hrrkjo>

Информация об авторах

Гончарова Анастасия Юрьевна[✉] — к.м.н., н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrap@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Information about the authors

Anastasiya Yu. Goncharova[✉] — Cand. Sci. (Med.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrap@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., и.о. зав. отделом иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Кислицина Екатерина Владимировна — м.н.с. отдела экспериментальных животных с виварием Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7565-2383>

Германчук Валерий Геннадиевич — д.м.н., г.н.с. отдела экспериментальных животных с виварием Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>

Участие авторов: *Гончарова А.Ю.* — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; *Бугоркова С.А.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Кислицина Е.В., Германчук В.Г.* — организация сбора и обработки материала. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ИСМЕ, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 01.10.2023;
принята к публикации 12.12.2023;
опубликована Online First 28.02.2024;
опубликована 29.04.2024

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), Head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Ekaterina V. Kislitsina — junior researcher, Department of experimental animals with vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7565-2383>

Valery G. Germanchuk — D. Sci. (Med.), chief researcher, Department of experimental animals with vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>

Author contribution: *Goncharova A.Yu.* — collection and processing of material, statistical processing, writing of text; *Bugorkova S.A.* — concept and design of the study, editing; *Kislitsina E.V., Germanchuk V.G.* — organization of the collection and processing of material. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 01.10.2023;
accepted for publication 12.12.2023;
published Online First 28.02.2024;
published 29.04.2024

ОБЗОРЫ

Обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-492>



Парвовирусная В19 инфекция: характеристика популяционного иммунитета в мире

Никишов О.Н.^{1✉}, Кузин А.А.¹, Лаврентьева И.Н.², Антипова А.Ю.², Никишов С.Н.³

¹Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

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

³Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

Аннотация

Парвовирусная В19 инфекция (ПВИ) представляет собой одну из относительно новых проблем в инфектологии, данные по её распространённости в России стали появляться только в начале XXI столетия. В статье приведены результаты анализа исследований из доступных источников литературы, освещающих распространённость маркеров ПВИ на популяционном уровне среди разных социальных групп населения. Клинические проявления ПВИ разнообразны, что требует дифференциальной диагностики как с экзантемными инфекционными заболеваниями, так и с неинфекционной патологией. В связи с особенностью патогенеза диагностика ПВИ актуальна для разных социально значимых контингентов населения, прежде всего пациентов с экзантемными проявлениями различных заболеваний, лиц из числа доноров крови, беременных женщин и женщин, планирующих беременность. В отличие от большинства стран, в России отсутствует система выявления и учёта ПВИ в системе государственного санитарно-эпидемиологического надзора, что затрудняет проведение исследований на эту тему.

Ключевые слова: обзор, парвовирус В19, иммуноглобулин G, иммуноглобулин M, доноры, беременные, экзантемные инфекции

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: Никишов О.Н., Кузин А.А., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Никишов С.Н. Парвовирусная В19 инфекция: характеристика популяционного иммунитета в мире. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024(2);101(2):259–269.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-492>

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

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-492>

Parvovirus B19 infection: characteristics of population immunity in the world

Oleg N. Nikishov^{1✉}, Alexander A. Kuzin¹, Irina N. Lavrentieva², Anastasia Yu. Antipova², Sergey N. Nikishov³

¹S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia;

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

³N.P. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

Abstract

Parvovirus B19 infection (PVI) is one of the relatively new problems in infectology, data on the study of its prevalence in our country began to appear only at the beginning of the twenty-first century. The article presents the results of an analysis of studies from available literature sources highlighting the prevalence of PVI markers at the population level among different social groups of the population at the present stage. The clinical manifestations of PVI are diverse, which requires differential diagnosis, both with exanthemic infectious diseases and with non-infectious pathology. Due to the peculiarity of PVI pathogenesis, it is relevant for various socially significant populations, primarily patients with exanthemic manifestations of various diseases, persons from among blood donors, pregnant women and women planning pregnancy. Furthermore, unlike most countries, our country does not have a system for PVI detecting and reporting in the system of state sanitary and epidemiological supervision, which makes it difficult to conduct research on this topic.

Keywords: review, parvovirus B19, immunoglobulins G and M, donors, pregnant women, exanthemic infections

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: Nikishov O.N., Kuzin A.A., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Nikishov S.N. Parvovirus B19 infection: characteristics of population immunity in the world. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):259–269.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-492>

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

Введение

Парвовирусная B19 инфекция (ПВИ) — облигатный антропоноз вирусной этиологии преимущественно с аэрозольным механизмом передачи возбудителя, а также трансплацентарным и гемотранфузионным путями передачи, основным клиническим признаком которой является инфекционная эритема, характеризующаяся появлением невезикулярной макуло-папулезной сыпи, клинически характеризующаяся невыраженными симптомами общинфекционной интоксикации, артралгией, поражением суставов, воспалительными изменениями в тканях плода и развитием апластического криза у больных с гемолитической анемией [1–4]. Возбудителем ПВИ является парвовирус человека B19 (B19V) (лат. *parvo* — мелкий), который впервые обнаружили британские вирусологи Y. Cossart и соавт. в 1974–1975 гг. при лабораторном обследовании образца плазмы крови здорового донора на наличие HBsAg [5]. Название возбудителя (B19V) исследователи связали с номером лунки планшета, содержащей образец сыворотки крови, из которого он был выделен.

Патогномичным клиническим проявлением ПВИ является инфекционная эритема, описанная в XVIII в. английским врачом R. Willian задолго до установления её этиологии [6]. Однако только в 1899 г. немецкий врач Sticker выделил её в самостоятельную нозологическую форму, а в 1905 г. L. Cheinisse ввёл в классификацию инфекционную эритему и определил её как «пятую болезнь» в числе 6 классических экзантем [7, 8]. Патогенное действие вируса было установлено лишь в 1981 г., когда исследователи обнаружили взаимосвязь между инфицированием детей с плоскочелюстной анемией и развитием у них в ряде случаев апластического криза [9]. В 1983 г. была подтверждена этиологическая роль

B19V в возникновении инфекционной эритемы [10]. Уже в 1984 г. появились сообщения о развитии водянки плода на фоне внутриутробного инфицирования B19V, что заканчивалось преждевременным прерыванием беременности и его гибелью [4, 12]. Эти научные факты свидетельствуют о расширении эпидемиологической значимости ПВИ и позволяют выделить группы риска среди людей, наиболее подверженных развитию осложнений при инфицировании B19V. В связи с появлением в современных условиях специфической лабораторной диагностики расширилась и география регистрации случаев ПВИ. В частности, она этиологически подтверждена на территориях стран Юго-Восточной Азии, в США, Европе, России [13]. Эпидемический процесс ПВИ характеризуется цикличностью: имеется большой (10-летний) и малые (каждые 3–4 года) циклы.

Необходимо отметить, что таксономическое положение B19V несколько раз пересматривалось, хронология этих изменений с 1991 г. по настоящее время представлена в табл. 1. Официально B19V был отнесён к семейству парвовирусов в 1985 г. В 2013 г. на съезде вирусологов в г. Эдинбурге (Шотландия) его назвали *Primate erithroparvovirus 1* и отнесли к семейству *Parvoviridae*, подсемейству *Parvovirinae*, роду *Erythroparvovirus*. В 2022 г. на очередном съезде его название не изменилось¹.

До 2005 г. считалось, что из семейства *Parvoviridae* подсемейства *Parvovirinae* рода *Erythroparvovirus* только один вид *Primate erithroparvovirus 1* является патогенным для человека. Однако в 2005 г. в Швеции Т. Алландер описал новый респираторный вирус из семейства парвовирусов, рода

¹ Virus Taxonomy: 2019 Release.

URL: <https://ictv.global/taxonomy/history>

Таблица 1. Таксономическое положение B19V
Table 1. The taxonomic position of human B19 parvovirus

Год Year	Источник Source	Семейство — подсемейство — род — вид Family — subfamily — genus — species
1991	ICTV 5 th Report	Parvoviridae — ... — Parvovirus — B19 virus
1993	Plenary session vote 10 August 1993 in Glasgow	Parvoviridae — Parvovirinae — Erythrovirus — B19 virus
2005	ICTV 8 th Report	Parvoviridae — Parvovirinae — Erythrovirus — Human parvovirus B19
2013	EC 45, Edinburgh, July 2013; Email ratification 2014	Parvoviridae — Parvovirinae — Erythroparvovirus —
2022	EC 54, July 2022; Email ratification 2023	Primate erythroparvovirus 1

Bocaparvovirus, получивший название «бокавирус человека» (вид HBoV1). Он был выделен от младенцев и детей, страдающих острыми респираторными заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей, методом молекулярного вирусного скрининга, основанным на клонировании и биоинформационном анализе [14, 15]. Данный возбудитель является четвёртым по распространённости вирусом, обнаруживаемым в респираторных образцах после аденовирусов, риновирусов и респираторно-синцитиального вируса (является причиной острых респираторных вирусных заболеваний в детском и подростковом возрасте в 9–20% случаев) [16–18].

Состояние уровня популяционного иммунитета у условно здоровых лиц

ПВИ достаточно широко распространена в мире и вызывает широкий спектр клинических проявлений. Метаанализ плазмы 93 636 здоровых лиц из числа доноров, который было проведён в 17 странах в 1993–2019 гг., показал распространённость маркеров IgG — 50,1% (95% ДИ 43,1–57,1%) и IgM — 2,2% (95% ДИ 1,3–3,7%) [19].

Серологическим маркером перенесённой инфекции является наличие B19V-вируспецифических IgG (ранее перенесённая инфекция) и IgM (маркер острой ПВИ инфекции). После перенесённой ПВИ сохраняется пожизненный иммунитет.

Заражение B19V, как правило, происходит в детском и подростковом возрасте (5–15 лет). Однако в эпидемический процесс вовлечены и взрослые, не имеющие иммунитета к ПВИ. Распространённость B19V-специфических IgG-антител в популяции зависит от возраста: 2–20% — у детей в возрасте до 5 лет, 15–40% — у детей в возрасте 5–18 лет, 40–80% — у взрослого населения [20–22].

Однако в разных регионах стран СНГ серопревалентность маркеров ПВИ различается. Так, при оценке состояния специфического иммунитета разных возрастных групп населения Москвы в 2015 г. было показано, что доля серопозитивных результатов увеличивалась с 25% у детей 1–2 лет до 56,3% в возрастной группе 30 лет и старше [20]. В то же время у жителей Республики Беларусь показана низкая серопревалентность в детских возрастных группах (0–2 года — 8,8%; 3–4 года — 11,8%) и более высокий уровень серопозитивных лиц в группе 40–44 года (85,4%) [23].

Оценка распространённости популяционного иммунитета против ПВИ среди условно здоровых лиц в России и за рубежом (**табл. 2**) подтверждает убиквитарный характер инфекции. Полученные данные свидетельствуют об активной циркуляции B19V, достаточно широкой распространённости ПВИ (частота встречаемости маркера ПВИ составила 47,4–66,0%) среди условно здоровых лиц.

Таблица 2. Частота выявления IgG среди условно здоровых лиц в разных странах
Table 2. The frequency of anti-B19V IgG antibodies detection among conditionally healthy of individuals in different countries

Страна Country	Число обследованных лиц Number of persons surveyed	Из них имеющие IgG-антитела Of these, having IgG-antibodies		Год публикации Year of publication	Источник Source
		абс. abs.	%		
Россия (Санкт-Петербург) Russia (St. Petersburg)	317	197	62,1	2020	[24]
Россия Russia	200	123	66,0	2019	[25]
Республика Беларусь Belarus	942	482	51,2	2014	[23]
Республика Узбекистан Uzbekistan	650	402	61,9	2019	[26]
Республика Таджикистан Tajikistan	114	54	47,4	2020	[24]
Республика Казахстан Kazakhstan	480	313	65,2	2020	[24]
Республика Сербия Serbia	552	339	59,6	2020	[24]
Гвинейская Республика Guinea	321	173	53,9	2020	[24]
Республика Хорватия Croatia	1538	986	64,1	2021	[25]

Вместе с тем наличие серонегативных к В19V лиц во всех возрастных группах создаёт условия для распространения инфекции, в том числе в группах риска (доноры крови, пациенты гематологического профиля, беременные женщины, лица из организованных коллективов).

Состояние уровня популяционного иммунитета и вирусной нагрузки В19V у доноров крови

Вирусная безопасность при переливании крови и её компонентов является одной из важнейших проблем трансфузиологии [27–29]. Современные достижения и научные открытия в области медицины, развитие трансплантологии, совершенствование оказания медицинской помощи населению и увеличение инвазивных вмешательств — всё это существенно повысило потребность лечебно-профилактических медицинских организаций в препаратах крови. Согласно требованиям отечественных нормативных документов, в их производстве предполагается использование сырья, свободного от вирусов или с минимальной вирусной нагрузкой². Вместе с тем, по данным отечественных и зарубежных источников, данная инфекция актуальна для такого значимого контингента людей, как доноры крови и её компонентов, т. к. реализуемая посредством гемоконтактного механизма передачи возбудителя ПВИ передаётся реципиентам — пациентам гематологического профиля и иммунокомпрометированным лицам [30]. Несмотря на продолжающиеся дискуссии о целесообразности скрининга доноров, Европейская фармакопея и Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США рекомендуют тестировать донорскую кровь на наличие В19V наряду с гемоконтактными инфекциями (ВИЧ, гепатиты В, С, D и др.) [28].

При изучении патогенеза ПВИ установлено, что В19V обладает тропностью к клеткам — предшественникам эритроцитов [31], что часто приводит у больных с различными формами гемолитической анемии к опасному для жизни осложнению — апластическому кризу. Установлено, что подавляющее число случаев данной патологии вызвано В19V [9, 32].

Для определения частоты встречаемости маркеров ПВИ среди доноров в ряде регионов нашей страны за последние годы был проведён скрининг различной степени масштабности. Так, при исследовании сыворотки крови от 1000 доноров в Нижегородской области авторами выявлено 10 (1%)

образцов, которые содержали ДНК В19V с вирусной нагрузкой 10^3 – 10^6 копий/мл. В 1 пробе выявлен IgM. Все ДНК-позитивные образцы содержали IgG (ДНК-негативные образцы содержали 29,7%), что составило 30,7% от общего числа доноров [33].

При проведении исследования по определению встречаемости В19V у популяций доноров было обследовано 510 человек (г. Грозный) и 1011 человек (г. Москва) [28]. У доноров Чеченской Республики выявлены 7 положительных образцов на ДНК В19V с вирусной нагрузкой 10^3 копий/мл и меньше (1,3%). У второй группы выявлено 20 (1,9%) положительных образцов на ДНК В19V, из них 8 (0,8%) — с вирусной нагрузкой 10^4 копий/мл и выше.

В Кировской области провели масштабное исследование плазмы доноров, используемой в промышленном производстве препаратов крови. В результате исследования нескольких десятков тысяч образцов установлено, что 0,003% доноров имеет концентрацию ДНК В19V 10^6 копий/мл и выше [29], что при пулировании может привести к заражению всего объёма плазмы.

Для оценки специфического гуморального иммунитета нами было изучено 500 образцов плазмы доноров. Установлено, что 426 (85,2%) имели IgG. Из этих образцов методом ПЦР была выявлена вирусная нагрузка у 74 (17,4%), причём у 12 (2,4%) она превысила 10^4 копий/мл.

Таким образом, даже немногочисленные исследования донорской крови, проведённые в нашей стране, коррелируют с данными исследований, проведённых в других странах, и показывают наличие вирусной ДНК в плазме крови, что свидетельствует об остроте скрыто протекающего эпидемического процесса, а значительная вирусная нагрузка определяет эпидемиологическую опасность гемопродуктов.

Обследование 93 636 доноров крови было проведено в 17 странах мира с 1993 по 2019 г. Согласно модели случайных эффектов, пул распространённости ДНК В19V составил 0,4% (95% ДИ 0,3–0,6%; I = 89,7%) [19]. В табл. 3 представлены страны с частотой выявления ДНК В19V 10^4 копий/мл и выше среди доноров крови.

Уровень распространённости ДНК В19V среди доноров крови в разных странах варьирует, что отчасти можно объяснить географическим расположением регионов, где проводились исследования, сезонными колебаниями, демографическими характеристиками, целью и чувствительностью используемого анализа, а также годом, когда были отобраны образцы крови (в связи с цикличностью эпидемического процесса).

Достаточная распространённость ДНК В19V в образцах крови доноров говорит о необходимости тестирования донорской крови на определение количества ДНК этого патогена с целью повышения

² Постановление Правительства РФ от 26.01.2010 № 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, её продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии».

Таблица 3. Частота выявления ДНК В19V у доноров крови в разных странах
Table 3. The frequency of B19V DNA detection in blood donors in different countries

Страна Country	Число обследованных доноров Number of donors surveyed	Из них имеющих ДНК PV 10 ⁴ копий/мл и выше Of these having DNA B19V 10 ⁴ copies/ml and above		Год публикации Year of publication	Источник Source
		абс. abs.	%		
Великобритания Great Britain	1000	9	0,9	2004	[34]
Гана Ghana	1000	13	1,3	2004	[34]
ЮАР South Africa	360	2	0,6	2004	[34]
США USA	5020	44	0,9	2007	[35]
Китай China	3957	23	0,6	2011	[36]
Россия Russia	1521	27	1,9	2012	[29]
Россия Russia	500	12	2,4	2019	[29]
Иран Iran	500	6	1,2	2018	[37]
Бразилия Brazil	480	9	1,9	2019	[38]

эпидемиологической безопасности гемопродуктов и недопущение образцов с концентрацией вируса 10⁴ копий/мл и выше.

Частота выявляемости маркеров ПВИ у беременных и её влияние на плод

Ещё одной актуальной социально значимой группой, которая подлежит эпидемиологическому мониторингу за ПВИ, являются беременные женщины и женщины, планирующие беременность. Это обусловлено повышенным риском эндогенных повреждений плода и последующими негативными событиями, которые могут происходить во время беременности на фоне внутриутробного инфицирования этим патогеном. Наиболее частому инфицированию подвергаются работники детских садов и школ. Учителя детских садов имеют риск развития острой ПВИ в 3 раза выше по сравнению с другими беременными женщинами, а школьные учителя — в 1,6 раза выше [39]. При инфицировании беременной женщины ПВИ риск передачи вируса плоду составляет в среднем 17–33% [11, 40]. При этом риск трансплацентарного заражения плода составляет 35–51% случаев [36, 41], частота неблагоприятных исходов беременности — 20–30%, гибель плода — 10–15% [42], в связи с чем ПВИ рассматривается как составная часть TORCH-комплекса [43]. По данным экспертов ВОЗ, риск гибели плода при заражении В19V женщины в первые 12 нед беременности, при сроке 13–20 нед и после 20 нед составляет 19, 15 и 6% соответственно [44]. Необходимо отметить, что во время беременности ПВИ распознаётся достаточно редко, т. к. в большинстве случаев протекает бессимптомно или по типу респираторной инфекции.

Механизм негативного действия возбудителя связан с тканевым тропизмом вируса, который способен поражать клетки плаценты, т. к. Р-анти-

ген (глобозид), являющийся основным рецептором для В19V, находится на поверхностях трофобласта и клеток ворсин хориона [11]. Кроме этого, специфические воспалительные изменения могут приводить к нарушению функционирования плаценты и неблагоприятному исходу беременности даже при отсутствии заражения плода. В этом случае причиной внутриутробной гибели плода является плацентарная недостаточность [45]. На фоне угнетения эритропоэза у плода наблюдается анемия и может происходить апластический криз с последующей гипоксией, вызывающей дисфункцию его различных органов [46]. При развитии вирусного миокардита возникают нарушения сердечного ритма, которые могут приводить к остановке сердечной деятельности у плода и его гибели [47]. Считается, что основным клиническим проявлением врождённой ПВИ является неиммунная водянка плода, которая в 80% случаев развивается во II триместре беременности [48, 49]. Врождённая ПВИ также может проявляться развитием гепатоспленомегалии, серповидно-клеточной анемии, отставанием в развитии и другими патологическими состояниями [45].

Учитывая негативное влияние В19V на плод, определение маркеров специфического гуморального иммунитета у женщин в I и II триместрах беременности является обоснованным. В ряде зарубежных стран данная инфекция отнесена к инфекциям группы TORCH, и поэтому женщин, планирующих беременность, и беременных обследуют на ПВИ. В нашей стране публикации на данную тему встречаются достаточно редко и носят противоречивый характер. Для определения риска возможного заражения женщин в период беременности в образцах плазмы крови обследуемых определяют наличие маркеров специфического противовирусного иммунитета, указывающих на острую (IgM) и перене-

сённую (IgG) ПВИ. Результаты серологического обследования женщин и прогнозирование возможных осложнений для плода приведены в **табл. 4**.

Скрининг и контроль за серологическим статусом беременных позволяет определить порядок дальнейших действий, необходимость дополнительных методов исследований и проведения профилактических мероприятий.

Уровень распространённости маркеров ПВИ среди беременных женщин в разных регионах мира колеблется в достаточно широких диапазонах, что отчасти можно объяснить географическим расположением регионов, природными факторами, демографическими характеристиками и национальными традициями, чувствительностью используемого анализа, разными проявлениями цикличности эпидемического процесса.

Определение распространённости маркеров специфического противовирусного иммунитета в группе беременных женщин в разных странах показывает, что до половины беременных женщин (25–46%) подвержены риску заражения и передачи трансплацентарным путём этого заболевания плоду (**табл. 5**). Активное распространение ПВИ среди женщин детородного возраста свидетельствует о риске инфицирования женщин в период беременности с возможностью неблагоприятных исходов

и может привести к различным осложнениям, особенно в I триместре беременности.

С целью профилактики острой ПВИ плода тактика наблюдения за беременной зависит от срока беременности, на котором произошло заражение.

В I триместре применяют УЗИ (скрининг воротникового пространства, доплерометрическое исследование венозной гемодинамики) для выявления анемии. На сроке до 20 нед беременности обследование плода следует начинать не позднее 4 нед после заболевания или сероконверсии матери. Если УЗИ показало развитие водянки плода, женщину следует предупредить о возможных последствиях заболевания. Если же нарушений плода не обнаружено, УЗИ продолжают делать с интервалом 1–2 нед. В группе высокого риска рекомендовано еженедельное доплеровское обследование средней церебральной артерии, пика систолической скорости кровотока и кровотока венозного протока [11].

Необходимо подчеркнуть, что в связи с отсутствием доступных средств специфической профилактики основное внимание должно быть сосредоточено на мероприятиях, направленных на выявление неиммунных беременных, предупреждение их заражения, и тщательном клиническом и серологическом мониторинге во время беременности. Всё это указывает на необходимость введения обяза-

Таблица 4. Результаты серологического обследования женщин и прогнозирование возможных осложнений для плода
Table 4. Results of serological examination of women and prediction of possible fetal complications

Результат Result	Интерпретация полученных данных Interpretation of the obtained data
IgG+, IgM–	Перенесённая в прошлом инфекция (нет риска для плода) A past infection (there is no risk to the fetus)
IgG+, IgM+	Инфекция в течение последних 7–120 дней (возможен риск для плода) Infection during the last 7–120 days (possible risk to the fetus)
IgG–, IgM+	Острая инфекция (максимальный риск для плода) Acute infection (maximum risk to the fetus)
IgG–, IgM–	Мать не обладает специфическим иммунитетом — есть риск заражения. Нет признаков острой инфекции. Если женщина была в очаге или контакте с больным, то необходимо повторить серологическое исследование через 3 нед. При этом появление IgM указывает на острую инфекцию The mother does not have a specific immunity — there is a risk of infection. There are no signs of acute infection. If the woman contacted with infected patient, then it is necessary to repeat the serological examination after three weeks. In this case, the appearance of IgM antibodies indicates an acute infection

Таблица 5. Серопревалентность IgG в крови беременных женщин в разных странах
Table 5. IgG seroprevalence in pregnant women in different countries

Страна Country	Число обследованных женщин The number of women surveyed	Из них имеющих IgG, % Of them having IgG antibodies, %	Год публикации Year of publication	Источник Source
Тунис Tunisia	404	76,2	2011	[50]
Финляндия Finland	558	58,6	2005	[51]
Иордания Jordan	439	51,3	2006	[52]
Нидерланды Netherlands	2567	70	2005	[53]
Италия Italy	1893	69,5	2022	[54]
Россия Russia	233	56,2	2019	[55]
Иран Iran	1954	54	2016	[56]
Кувейт Kuwait	1047	53,3	1999	[57]

тельного обследования беременных (скрининга) на наличие маркеров ПВИ.

Частота определения маркеров ПВИ у пациентов с экзантемными проявлениями инфекционного процесса

С 2002 г. в России, согласно рекомендациям Европейского регионального бюро ВОЗ, реализуется стратегический план по элиминации эндемичной кори, краснушной инфекции и предупреждению врождённой краснушной инфекции. Достигнутые успехи по снижению заболеваемости этих инфекций послужили фактором, благодаря которому стало больше уделяться внимания другим заболеваниям, протекающим с экзантемными проявлениями инфекционного процесса. Возникновение экзантемы, как правило, происходит в начале заболевания и является ведущим клиническим симптомом для проведения дифференциальной диагностики. К одной из таких наиболее часто встречающихся инфекций относится ПВИ. Основной формой заболевания является инфекционная эритема («пятая болезнь»), которая регистрируется в Международной классификации болезней (МКБ-10) под шифром B08.3.

За рубежом с момента открытия вируса проведено большое количество научных исследований по изучению эпидемиологии, диагностике и клиническим проявлениям ПВИ. В нашей стране исследования стали проводиться только с начала текущего столетия, и их количество явно недостаточно для определения распространённости маркеров ПВИ, особенно в социально значимых группах.

Однако из доступных источников получены отдельные данные о распространённости ПВИ среди обследованных лиц с экзантемными проявления-

ми инфекционного процесса в некоторых регионах нашей страны и других странах (табл. 6).

Наибольшее число обследованных пациентов было в Республике Беларусь, где выявлена наибольшая доля острой ПВИ среди всех острых экзантемных заболеваний. Если рассматривать возрастную структуру, то здесь доминирует детский возраст. IgM к B19V выявлен в возрастных группах 4–6 лет (22,5%) и 7–10 лет (22,6%), что говорит о том, что основной формой заболевания ПВИ в детском возрасте является инфекционная эритема, а наименьшее количество маркера острой ПВИ определялось в старших возрастных группах — 40–49 лет (3,05%) и 50–64 года (1,6%).

Для оценки частоты встречаемости IgM-антител к B19V в Северо-Западном федеральном округе до и после принятия ограничительных мер в связи с пандемией COVID-19 Санкт-Петербургским региональным центром по надзору за корью и краснухой были исследованы сыворотки крови из своей коллекции. IgM-антитела к B19V (лабораторный маркер острой ПВИ) определили в 1695 образцах с 11 территорий округа.

ПВИ была лабораторно подтверждена в 198 (11,7%) пробах. Для сравнения: в 2012 г. доля положительных проб от числа исследованных составила 20,4%, в 2015 г. — 14,9% (табл. 6). На территории России ограничительные меры в связи с COVID-19 были введены с 30.03.2020. В 2020 г. доля положительных образцов с подтверждённой ПВИ составила 8,9%; в 2021 г. — 10,2%. В 2022 г. социальные ограничения были полностью сняты. При исследовании образцов сывороток крови от пациентов с лихорадкой и сыпью IgM-антитела к B19V были выявлены в 14,8% случаев. Данные проведённых

Таблица 6. Частота определения IgM B19V у пациентов с экзантемными проявлениями инфекционного процесса

Table 6. The frequency of detection of anti-B19V IgM antibodies in patients with exanthemic manifestations of the infectious process

Страна Country	Число обследованных- лиц с экзантемой The number of examined persons with exanthema	Из них имеющих IgM B19V, % Of those with anti-B19V IgM antibodies, %	Год публикации Year of publication	Источник Source
Россия, Южный федеральный округ Russia, Southern Federal District	184	8,2	2008	[58]
Россия, Северо-Западный федеральный округ Russia, Northwestern Federal District	465	20,4	2012	[59]
Россия, Северо-Западный федеральный округ Russia, Northwestern Federal District	336	14,9	2015	[59]
Республика Беларусь Belarus	4919	27,8	2021	[60, 61]
Аргентина Argentina	141	14,9	2012	[62]
Россия Russia	69	20,1	2019	[55]
Италия Italy	390	5,1	2015	[63]
Иран Iran	583	19,2	2016	[64]
Куба Cuba	298	10,7	2019	[65]
Болгария Bulgaria	1266	22	2016	[66]

Таблица 7. Доля лабораторно подтвержденной ПВИ В19 при разных предварительных диагнозах**Table 7.** The proportion of laboratory-confirmed B19 PVI in different preliminary diagnoses

Предварительный клинический диагноз Preliminary clinical diagnosis	Количество исследованных сывороток крови, абс. The number of serums, abs.	Количество положительных проб IgM PV В19, абс. The number of anti-B19V IgM positive samples, abs.	Доля лабораторно подтвержденной ПВИ, % The proportion of laboratory-confirmed PVI, %
I класс I class			
Экзантема неясной этиологии Exanthema of unclear etiology	32	7	21,9
Инфекционный мононуклеоз Infectious mononucleosis	6	2	33,3
ВИЧ-инфекция HIV infection	1	0	0
Герпесвирусная инфекция Herpesvirus infection	1	1	100
Тромбоцитопения Thrombocytopenia	2	0	0
Токсикодермия Toxicoderma	4	0	0
Лихорадка неясного генеза Fever of unknown origin	2	0	0
Псевдотуберкулёз Pseudotuberculosis	1	0	0
Итого Total	49	10	20,4
X класс X class			
Острые респираторные вирусные инфекции верхних дыхательных путей Acute respiratory viral infections of the upper respiratory tract	14	1	7,1
Ангина Tonsillitis	2	1	50,0
Бронхит Bronchitis	2	1	50,
Пневмония Pneumonia	2	1	50,0
Итого Total	20	4	20,0
Всего In total	69	14	20,3

исследований показывают, что режимно-ограничительные мероприятия, введённые в связи с пандемией COVID-19, сыграли свою роль, в частности, в снижении заболеваемости острой ПВИ, как и других инфекций с аэрозольным механизмом передачи.

При проведении собственных исследований пациентов с экзантемными проявлениями различных заболеваний было обследовано 69 пациентов, поступивших в инфекционный стационар Санкт-Петербурга. Структура проб с выявленными IgM-антителами к В19V в сыворотке крови больных с различными заболеваниями, протекавшими с экзантемой, представлена в **табл. 7**.

По итогам проведённого исследования необходимо отметить, что ни в одном случае диагноз ПВИ не был поставлен пациентам. Таким образом, проблема ранней диагностики ПВИ у больных, поступающих в инфекционный стационар с синдромом экзантемы, обусловлена объективными трудностями, связанными с разнообразием проявлений в клинической картине. Кроме этого, немаловажную роль играет недостаточное знание врачами основных клинических синдромов, характерных для ПВИ, ввиду относительно небольшой доли данной инфекции среди других инфекционных заболеваний.

Заключение

Результаты обзора литературы показали наличие скрыто протекающего эпидемиологического процесса ПВИ среди различных социальных групп населения во многих странах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для профилактики гемоконтактного заражения В19V важно включить в перечень обязательного исследования крови доноров на наличие ДНК В19V с определением вирусной нагрузки с целью повышения эпидемиологической безопасности гемопродуктов и выбраковывания образцов с концентрацией вируса 10^4 и более копий/мл. В19V представляет потенциальную опасность для беременных. Риск заражения беременных, возможность трансплацентарной передачи с возможностью развития тяжёлого врождённого заболевания достаточно высоки. В нашей стране нет точных данных о частоте ПВИ среди женщин детородного возраста, частоте врождённой инфекции. Поэтому все беременные женщины и женщины, планирующие беременность, должны подвергаться скринингу на маркеры ПВИ вне зависимости от возраста и количества беременностей. Иммунологическое обследование беременных из группы риска не только позволит своевременно выявить ПВИ, но и бу-

дет способствовать снижению развития патологии беременности и гибели плода. Острая форма ПВИ распространена среди инфекционных заболеваний, протекающих с экзантемными проявлениями, а также при болезнях органов дыхания с атипичным течением. Однако окончательный диагноз ПВИ можно поставить только по результатам проведённых лабораторных методов исследования. В связи с этим пациентам с экзантемой необходимо проводить лабораторные исследования для выявления специфических IgM-антител не только к вирусу кори и краснухи, но и к В19V с целью дифференциальной диагностики экзантемных заболеваний.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Алимбарова Л.М. Парвовирусы (Parvoviridae). В кн.: Львов Д.К. *Медицинская вирусология*. М.;2008:276–84. Alimbarova L.M. Parvoviruses (Parvoviridae). In: Lvov D.K. *Medical Virology*. Moscow;2008:276–84.
2. Никишов О.Н., Кузин А.А., Антипова А.Ю., Лаврентьева И.Н. Парвовирусная инфекция – современная проблема в эпидемиологии и клинической медицине. *Эпидемиология и профилактика*. 2015;14(4):29–36. Nikishov O.N., Kuzin A.A., Antipova A.Yu., Lavrentieva I.N. Parvovirus infection — contemporary issues in epidemiology and clinical medicine. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;14(4):29–36. EDN: <https://elibrary.ru/uhyrpl>
3. Антипова А.Ю. Значение лабораторной диагностики краснушной и парвовирусной инфекций в период элиминации краснухи: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. СПб.;2013. Antipova A.Yu. *The importance of laboratory diagnostics of rubella and parvovirus infections during the elimination of rubella*: Diss. St. Petersburg;2013. EDN: <https://elibrary.ru/zowdlt>
4. Кириенко В.Т., Зайцев И.А., Потий В.В., Нестерук Е.С. Парвовирусная инфекция В19V: обзор литературы. Часть 1. *Актуальная инфектология*. 2019;7(5):243–51. Kirienko V.T., Zaitsev I.A., Potiy V.V., Nesteruk Ye.S. Parvovirus infection B19V: review of literature. Part 1. *Actual Infectology*. 2019;7(5):243–51. DOI: <https://doi.org/10.22141/2312-413x.7.5.2019.183703> EDN: <https://elibrary.ru/rgjpzo>
5. Cossart Y., Field A., Cant B., Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1975;1(7898):72–3. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)91074-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)91074-0)
6. Baylis S.A. Standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for different genotypes of parvovirus B19: a meeting summary. *Vox Sang*. 2008;94(1):74–80. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00992.x>
7. Lou S., Xu B., Huang Q., et al. Molecular characterization of the newly identified human parvovirus 4 in the family Parvoviridae. *Virology*. 2012;422(1): 59–69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.033>
8. Боткина А.С. Вирусные экзантемы в практике педиатра. *Практика педиатра*. 2016;(2):54–9. Botkina A.S. Viral exanthems in pediatrician's practice. *Paediatrician practice*. 2016;(2):54–9. EDN: <https://elibrary.ru/vsdump>
9. Serjeant G.R., Topley J.M., Mason K. Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet*. 1981;2(8247):595–7. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92739-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92739-2)
10. Anderson M.J., Jones S.E., Fisher-Hoch S.P., et al. Human parvo virus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet*. 1983;1(8338):1378. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)92152-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)92152-9)
11. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю. Парвовирус В19 человека: характеристика возбудителя, распространение и диагностика обусловленной им инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2013;3(4):311–22. Lavrent'eva I.N., Antipova A.Yu. Human Parvovirus B19: characteristics of the pathogen, spread and diagnosis of the infection caused by it. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2013;3(4):311–22. EDN: <https://elibrary.ru/rstjpl>
12. Шипулин Г.А., Белковская М.Э., Мальмберг О.Л. и др. Неиммунная водянка плода: диагностика и тактика. *Акушерство и гинекология*. 2009;(2):37–40. Shipulin G.A., Belkovskaya M.E., Malmberg O.L. and others. Nonimmune fetal hydrops: diagnosis and tactics. *Obstetrics and Gynecology*. 2009;(2):37–40. EDN: <https://elibrary.ru/kgwksn>
13. Долгих Т.И. *Современные возможности лабораторной диагностики инфекционных заболеваний (методы, алгоритмы, интерпретация результатов)*. Омск;2005. Dolgikh T.I. *Modern Possibilities of Laboratory Diagnostics of Infectious Diseases (Methods, Algorithms, Interpretation of Results)*. Omsk;2005.
14. Allander T., Tammi M.T., Eriksson M., et al. Cloning of human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005;102(36):12891–6. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>
15. Mohammadi M. HBoV-1: virus structure, genomic features, life cycle, pathogenesis, epidemiology, diagnosis and clinical manifestations. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2023;13:1198–221. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1198127>
16. Allander T., Jartti T., Gupta S., et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin. Infect. Dis*. 2007;44(7):904–10. DOI: <https://doi.org/10.1086/512196>
17. Arden K.E., McErlean P., Nissen M.D., et al. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J. Med. Virol*. 2006;78(9):1232–40. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.20689>
18. Arnold J., Singh K., Spector S., Sawyer M.H. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin. Infect. Dis*. 2006;43(3):283–8. DOI: <https://doi.org/10.1086/505399>
19. Farahmand M., Tavakoli A., Ghorbani S., et al. Molecular and serological markers of human parvovirus B19 infection in blood donors: A systematic review and meta-analysis. *Asian J. Transfus. Sci*. 2021;15(2):212–22. DOI: https://doi.org/10.4103/ajts.ajts_185_20
20. Редненко А.И., Семёнов В.М., Дмитраченко Т.И. и др. Клинико-эпидемиологические особенности парвовирусной инфекции. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2019;18(3):234–40. Rednenko A.I., Semenov V.M., Dmitrachenko T.I., et al. Clinical and epidemiological features of parvovirus infection. *Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2019;18(3):234–240. DOI: <https://elibrary.ru/dbjxsm>
21. Mor O., Ofir I., Pavel R., et al. Parvovirus B19V infection in Israel: prevalence and occurrence of acute infection between 2008 and 2013. *Epidemiol. Infect*. 2016;144(1):207–14. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0950268815000230>
22. Qiu J., Söderlund-Venermo M., Young N.S. Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev*. 2017;30(1):43–113. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00040-16>
23. Ермолович М.А., Дронина А.М., Самойлович Е.О. Распространенность IgG-антител к парвовирусу В19 среди жителей Республики Беларусь. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(2):27–32. Ermolovich M.A., Dronina A.M., Samoilovich E.O. Prevalence of IgG antibodies to parvovirus B19 in population of Belarus. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(2):27–32. EDN: <https://elibrary.ru/sbeukl>
24. Хамитова И.В. *Лабораторные маркеры парвовирусной инфекции и молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19 в отдельных географических регионах*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. СПб.;2020. Khamitova I.V. *Laboratory markers of parvovirus infection and*

- molecular genetic characteristics of isolates of parvovirus B19 in selected geographical regions*: Diss. St. Petersburg;2020. EDN: <https://elibrary.ru/quknku>
25. Vilibic-Cavlek T., Tabain I., Kolaric B., et al. Parvovirus B19 in Croatia: a large-scale seroprevalence study. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(11):1279. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina57111279>
 26. Ризаева Ф.А., Каримов Х.Я. Сравнительный анализ частоты выявления серологического маркера парвовируса В19 среди условно здоровых лиц и пациентов гематологического стационара. *Вестник гематологии*. 2019;15(3):57–8. Rizaeva F.A., Karimov Kh.Ya. Comparative analysis of the frequency of detection of the serological marker of parvovirus B19 among conditionally healthy individuals and patients of a hematology hospital. *The Bulletin of Hematology*. 2019;15(3):57–8. EDN: <https://elibrary.ru/rzrcgv>
 27. Никишов О.Н. Проблема вирусной безопасности при переливании крови и ее компонентов. *Информационный архив*. 2016;9(3-4):111–2. Nikishov O.N. The problem of viral safety in blood transfusion and its components. *Information Archive*. 2016;9(3-4):111–2.
 28. Элижбаева М.А. *Парвовирус В19 у доноров крови и больных гематологического стационара*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.;2011. Elizhbaeva M.A. *Parvovirus B19 in blood donors and patients of the hematology hospital*: Diss. Moscow;2011. EDN: <https://elibrary.ru/qkfkqr>
 29. Попцов А.Л. *Значение индикации ДНК парвовируса В19 в обеспечении инфекционной безопасности плазмы для фракционирования*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Киров;2015. Poptsov A.L. *The significance of DNA indication of parvovirus B19 in ensuring the infectious safety of plasma for fractionation*: Diss. Kirov;2015. EDN: <https://elibrary.ru/djfuju>
 30. Florea A.V., Ionescu D.N., Melhem M.F. Parvovirus B19 infection in the immunocompromised host. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2007;131(5):799–804. DOI: <https://doi.org/10.5858/2007-131-799-pbiiti>
 31. Zakrzewska K., Corvito R., Tonello C., et al. Human parvovirus B19 experimental infection in human fibroblasts and endothelial cells cultures. *Virus Res.* 2005;114(1-2):1–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.05.003>
 32. Burrell C.J., Howard C.R., Murphy F.A. Chapter 21: Parvoviruses. In: White D.O., Fenner F.J. *Medical Virology (Fifth Edition)*. Elsevier;2017:289–96.
 33. Филатова Е.В., Зубкова Н.В., Новикова Н.А. и др. Определение маркеров парвовируса В19 в образцах крови доноров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010;87(5):67–70. Filatova E.V., Zubkova N.V., Novikova N.A., et al. Identification of markers of parvovirus B19 in blood samples from donors. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010;87(5):67–70. EDN: <https://elibrary.ru/vyzoaf>
 34. Candotti D., Etiz N., Parsyan A., Allain J.P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* 2004;78(22):12169–78. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.22.12169-12178.2004>
 35. Kleinman S., Glynn S., Lee T., et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion*. 2007;47(10):1756–64. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01341.x>
 36. Ke L., He M., Li C., et al. The prevalence of human parvovirus B19 DNA and antibodies in blood donors from four Chinese blood centers. *Transfusion*. 2011;51(9):1909–18. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03067.x>
 37. Zadsar M., Aghakhani A., Banifazl M., et al. Seroprevalence, molecular epidemiology and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in Iranian blood donors. *J. Med. Virol.* 2018;90(8):1318–22. EDN: <https://doi.org/10.1002/jmv.25195>
 38. Slavov S., Rodrigues E.S., Sauvage V., et al. Parvovirus B19 seroprevalence, viral load, and genotype characterization in volunteer blood donors from southern Brazil. *J. Med. Virol.* 2019;91(7):1224–31. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.25453>
 39. Кириенко В.Т., Зайцев И.А., Потий В.В., Нестерук Е.С. Парвовирусная инфекция В19V у беременных (обзор литературы). Часть 2. *Актуальная инфектология*. 2020;8(1):8–16. Kirienko V.T., Zaitsev I.A., Potiy V.V., Nesteruk Ye.S. Parvovirus infection B19V in pregnant women (literature review). Part 2. *Actual Infectology*. 2020;8(1):8–16. DOI: <https://doi.org/10.22141/2312-413x.8.1.2020.196166> EDN: <https://elibrary.ru/trvwxo>
 40. Wong A., Tan K.H., Tee C.S., Yeo G.S. Seroprevalence of cytomegalovirus, toxoplasma and parvovirus in pregnancy. *Signapore Med. J.* 2000;41(4):151–5.
 41. Chen A.Y., Zhang E.Y., Guan W., et al. The small 11 kDa non-structural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood*. 2010;115(5):1070–80. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-215756>
 42. Ornoy A., Ergaz Z. Parvovirus. B 19 infection during pregnancy and risks to the fetus. *Birth Defects Res.* 2017;109(5):311–23. DOI: <https://doi.org/10.1002/bdra.23588>
 43. Schneider B., Höne A., Tolba R.H., et al. Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 2008;89(Pt. 1):164–176. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.83053-0>
 44. Centres for Disease Control. Current trends risks associated with human Parvovirus B19 infection. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 1989;38(6):81–88,93–97.
 45. Young N.S., Brown K.E. Parvovirus B19. *Engl. J. Med.* 2004;350(6):586–97. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmra030840>
 46. Riipinen A., Väisänen E., Nuutila M., et al. Parvovirus B19 infection in fetal deaths. *Clin. Infect. Dis.* 2008;47(12):1519–25. DOI: <https://doi.org/10.1086/593190>
 47. De Jong E.P., de Haan T.R., Kroes A.S., et al. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *J. Clin. Virol.* 2006;36(1):1–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.004>
 48. O'Malley A., Barry-Kinsella C., Hughes C., et al. Parvovirus infects cardiac myocytes in hydrops fetalis. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2003;6(5):414–20. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10024-001-0269-x>
 49. Чернова Т.М., Тимченко В.Н., Павлова Е.Б. и др. Парвовирусная В19 инфекция: лекция. *Детские инфекции*. 2022;21(3):39–46. Chernova T.M., Timchenko V.N., Pavlova E.B., et al. Parvovirus B19 infection: lecture. *Children Infections*. 2022;21(3):39–46. DOI: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2022> EDN: <https://elibrary.ru/satsdn>
 50. Hannachi N., Marzouk M., Harrabi I., et al. Seroprevalence of rubella virus, varicella zoster virus, cytomegalovirus and parvovirus B19 among pregnant women in the Sousse region, Tunisia. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2011;104(1):62–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13149-010-0119-z> (in French)
 51. Alanen A., Kahala K., Vahlberg T., et al. Seroprevalence, incidence of prenatal infections and reliability of maternal history of varicella zoster virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus and parvovirus B19 infection in South-Western Finland. *BJOG*. 2005;112(1):50–6. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2004.00320.x>
 52. Bdour S. Risk of perinatal transmission of rubella and parvovirus B19 in Jordanian pregnant women. *Vaccine*. 2006;24(16):3309–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.01.025>
 53. Van Gessel P.H., Gaytant M.A., Vossen A.C., et al. Incidence of parvovirus B19 infection among an unselected population of pregnant women in the Netherlands: A prospective study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2006;128(1-2):46–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2005.11.042>
 54. De Paschale M., Pavia C., Cerulli T., et al. Prevalence of anti-parvovirus B19 IgG and IgM and parvovirus B19 viremia in

ОБЗОРЫ

- pregnant women in an urban area of Northern Italy. *J. Med. Virol.* 2022;94(11):5409–14.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.27963>
55. Никишов О.Н. *Клинико-эпидемиологические проявления парвовирусной инфекции и состояние гуморального иммунитета среди различных групп населения*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб.;2019. Nikishov O.N. *Clinical and epidemiological manifestations of parvovirus infections and the state of humoral immunity among various population groups*: Diss. St. Petersburg;2019.
EDN: <https://elibrary.ru/wtwwfyk>
56. Moosazadeh M., Alimohammadi M., Mousavi T. Seroprevalence and geographical distribution of parvovirus B19 antibodies in pregnant women: A-meta-analysis. *J. Immunoassay Immunochem.* 2023;44(2):103–16.
DOI: <https://doi.org/10.1080/15321819.2023.2167520>
57. Maksheed M., Pansa A.S., Essa S.S., et al. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in pregnant women in Kuwait. *Acta Trop.* 1999 ;73(3) :225–9.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(99\)00033-9](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(99)00033-9)
58. Говорухина М.В. *Серологическая элиминация кори в период элиминации*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону;2008. Govorukhina M.V. *Serological elimination of measles during the elimination period*: Diss. Rostov-na-Donu;2008. EDN: <https://elibrary.ru/wzkkft>
59. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Бичурина М.А. и др. Выявление случаев парвовирусной инфекции в системе эпидемиологического надзора за экзантемными заболеваниями. *Инфекция и иммунитет*. 2016;6(3):219–24. Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Bichurina M.A., et al. Detection of cases of parvovirus infection in the system for epidemiological surveillance of exanthematic diseases. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2016;6(3):219–24.
EDN: <https://elibrary.ru/wwyllj>
60. Ермолович М.А., Дронина А.М., Самойлович Е.О. Эпидемический процесс острой парвовирусной инфекции в Республике Беларусь. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016;(5):13–20. Ermolovich M.A., Dronina A.M., Samoiloich E.O. The epidemic process of acute parvovirus infection in the Republic of Belarus. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2016;(5):13–20.
EDN: <https://elibrary.ru/xemfdr>
61. Yermalovich M.A., Dronina A.M., Semeiko G.V., et al. Comprehensive surveillance data suggest a prominent role of parvovirus B19 infection in Belarus and the presence of a third subtype within subgenotype 1a. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 1225.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79587-2>
62. Pedranti M.S., Barbero P., Wolff C., et al. Infection and immunity for human parvovirus B19 in patients with febrile exanthema. *Epidemiol. Infect.* 2012;140(3):454–61.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268811000823>
63. Drago F., Ciccarese G., Broccolo F., et al. Atypical exanthems associated with Parvovirus B19 (B19V) infection in children and adults. *J. Med. Virol.* 2015;87(11):1981–8.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24246>
64. Rezaei F., Sarshari B., Ghavami N., et al. Prevalence and genotypic characterization of Human Parvovirus B19 in children with measles- and rubella-like illness in Iran. *J. Med. Virol.* 2016;88(6):947–53. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24425>
65. de Los Angeles Ribas M., Tejero Y., Cordero Y., et al. Identification of human parvovirus B19 among measles and rubella suspected patients from Cuba. *J Med Virol.* 2019;91(7):1351–4.
DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.25444>
66. Ivanova S.K., Mihneva Z.G., Toshev A.K., et al. Insights into epidemiology of human parvovirus B19 and detection of an unusual genotype 2 variant, Bulgaria, 2004 to 2013. *Euro Surveill.* 2016;21(4).
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.4.30116>

Информация об авторах

Никишов Олег Николаевич — к.м.н., доцент кафедры общей и военной эпидемиологии ВМА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, nikishov.oleg2015@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3677-1734>

Кузин Александр Александрович — д.м.н., профессор, начальник кафедры общей и военной эпидемиологии ВМА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9154-7017>

Лаврентьева Ирина Николаевна — д.м.н., в.н.с. лаб. экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Антипова Анастасия Юрьевна — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7763-535X>

Никишов Сергей Николаевич — к.психол.н. доцент, зав. каф. психологии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1573-6825>

Участие авторов. Никишов О.Н., Кузин А.А., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю. — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, концепция и дизайн исследования; Никишов С.Н. — концепция и дизайн исследования, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 26.01.2024;
принята к публикации 14.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Oleg N. Nikishov — Cand. Sci. (Med), Associate Professor, Department of general and military epidemiology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia, nikishov.oleg2015@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3677-1734>

Alexander A. Kuzin — D. Sci. (Med.), Professor, Chief, Department of general and military epidemiology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9154-7017>

Irina N. Lavrentieva — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of experimental virology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Anastasia Yu. Antipova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental virology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7763-535X>

Sergey N. Nikishov — Cand. Sci. (Psych.), Head, Department of Psychology, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1573-6825>

Author contribution. Nikishov O.N., Kuzin A.A., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu. — collection and processing of material, statistical processing, writing the text, concept and design of the study; Nikishov S.N. — concept and design of the study, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 26.01.2024;
accepted for publication 14.03.2024;
published 29.04.2024

Обзорная статья
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-470>



Рекомбиназная полимеразная амплификация: характеристика метода и применение в диагностике инфекционных заболеваний

Бондарева О.С.✉, Батурин А.А., Миронова А.В.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград, Россия

Аннотация

В последние годы технологии на основе изотермической амплификации активно развиваются и постепенно внедряются в арсенал методов диагностики инфекционных заболеваний. Одним из наиболее быстрых изотермических методов является рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА). Данный обзор содержит информацию о принципе РПА, значении отдельных компонентов реакции и характеристике праймеров. Включены сведения об особенностях различных способов детекции результатов РПА, влиянии ингибиторов, температуры и перемешивания на эффективность реакции. Описаны подходы к проведению количественной и мультиплексной РПА, а также некоторые варианты портативных устройств для выявления возбудителей инфекционных заболеваний. В заключении обобщены преимущества и недостатки РПА по сравнению с другими методами амплификации.

Ключевые слова: рекомбиназная полимеразная амплификация, обзор

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: Бондарева О.С., Батурин А.А., Миронова А.В. Рекомбиназная полимеразная амплификация: характеристика метода и применение в диагностике инфекционных заболеваний. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2024;101(2):270–280.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-470>

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

Review
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-470>

Recombinase polymerase amplification: method's characteristics and applications in diagnostics of infectious diseases

Olga S. Bondareva✉, Artem A. Baturin, Anna V. Mironova

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

Abstract

Isothermal amplification techniques have been actively developed in recent years and are gradually introduced into the range of methods for infectious disease diagnostics. One of the fastest isothermal methods is recombinase polymerase amplification (RPA). This review contains information about the principle of RPA, the role of individual reaction components and primer design considerations. It provides information on characteristics of various methods of RPA results detection, effects of inhibitors, temperature and agitation on the efficiency of reaction. Approaches to quantitative and multiplex RPA are described, as well as some variants of portable devices designed to identify infectious agents. The conclusion summarizes advantages and disadvantages of RPA in comparison with other amplification methods.

Keywords: recombinase polymerase amplification, RPA, review

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: Bondareva O.S., Baturin A.A., Mironova A.V. Recombinase polymerase amplification: method's characteristics and applications in diagnostics of infectious diseases. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):270–280.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-470>
EDN: <https://www.elibrary.ru/zphlvm>

Введение

Методы амплификации нуклеиновых кислот (НК) широко используются в лабораторной диагностике для выявления возбудителей инфекционных заболеваний, определения вирусной нагрузки, генотипирования патогенов. В последние годы интенсивно развиваются методы, основанные на изотермической амплификации. Протекание реакции при одной температуре позволяет проводить анализ в условиях ограниченных ресурсов, а также сокращает время исследования.

Анализ числа публикаций в базе данных PubMed, посвящённых методам изотермической амплификации, за последние 3 года показал, что наиболее популярным методом является петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP), использованию которой посвящено около половины статей, на втором месте — рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА; 27% статей), затем амплификация по типу катящегося кольца — 16% публикаций, остальные изотермические методы в совокупности заняли менее 7% от общего числа публикаций (рис. 1, а).

Метод РПА был предложен относительно недавно, в 2006 г., группой учёных под руководством N.A. Armes [1]. В последние годы отмечается ежегодный рост числа публикаций, посвящённых РПА (рис. 1, б), что свидетельствует об активном интересе к данной технологии.

Принцип метода РПА заключается в моделировании *in vitro* естественного биологического процесса — гомологичной рекомбинации; при этом денатурация двойной цепи ДНК осуществляется благодаря действию нескольких ферментов и реагентов (рис. 2).

Основной фермент РПА — рекомбиназа — является гомологом белка RecA *Escherichia coli*. В процессе гомологичной рекомбинации RecA связывается с одноцепочечной ДНК, осуществляет поиск комплементарной последовательности на гомологичной хромосоме, внедряется в неё, образуя гетеродуплекс и вытесняя вторую цепь.

Реакция РПА начинается с присоединения рекомбиназы к праймерам посредством белка T4 UvsY. Сформировавшийся нуклеопротеиновый комплекс при сближении с гомологичной последовательностью двухцепочечной ДНК расплетает её, способствуя отжигу праймера. При этом образуется D-петля. Раскрученные одноцепочечные нити

стабилизируют SSB белки T4 gp32. После отсоединения рекомбиназы происходит посадка Vsu-полимеразы (или Sau-полимеразы) и элонгация целевой мишени с вытеснением комплементарной цепи. В результате образуются два дуплекса, которые выступают в качестве матрицы при экспоненциальной амплификации. Фактор краудинга (высокомолекулярный полиэтиленгликоль, PEG 35K) способствует имитации условий *in vivo* и катализирует работу ферментов. Дитиотреитол стабилизирует работу ферментов; фосфокреатинин, креатинкиназа и аденозинтрифосфат обеспечивают систему энергией. Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты используются для синтеза ампликонов. Для поддержания необходимого pH применяют буфер, содержащий трис и другие соли. Ацетат магния выступает в роли кофактора ферментов и инициирует РПА [2].

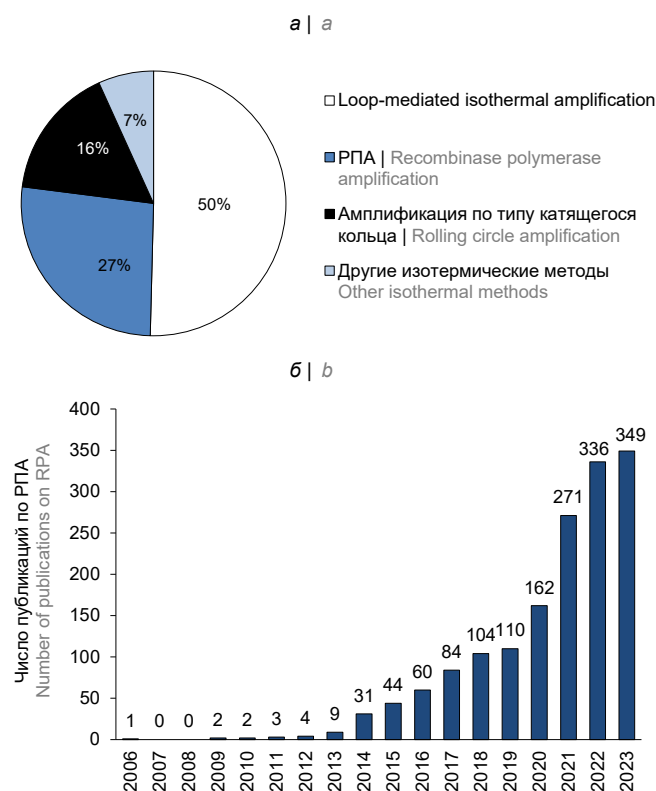


Рис. 1. Анализ публикационной активности по методам изотермической амплификации согласно базе данных PubMed NCBI (а) за последние 3 года; б — по РПА.

Fig. 1. Analysis of publication activity on isothermal amplification methods according to the PubMed NCBI database (a) over the past 3 years; b — on RPA.

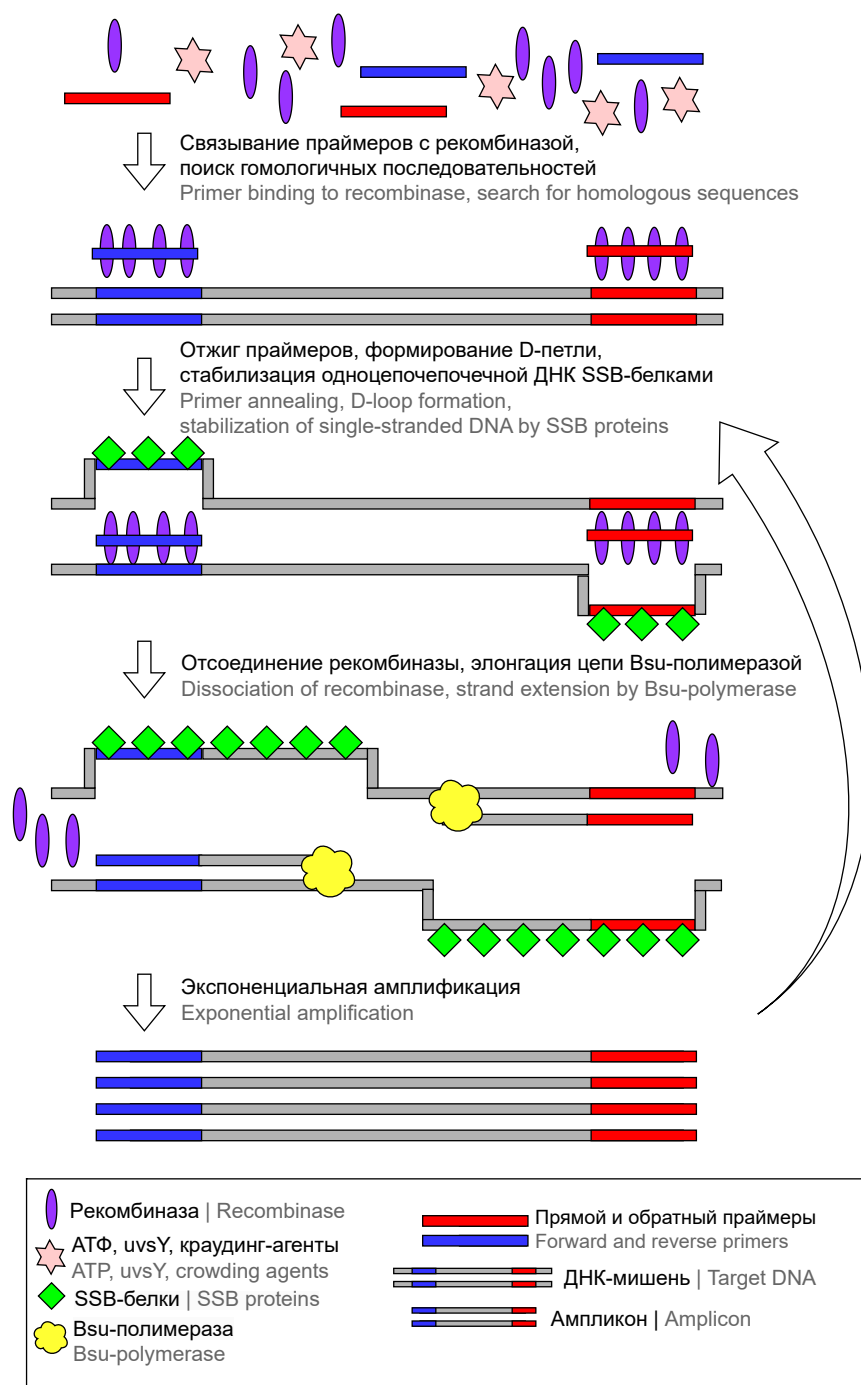


Рис. 2. Механизм РПА.

Fig. 2. Schematic representation of recombinase polymerase amplification.

При добавлении в реакционную смесь обратной транскриптазы в качестве матрицы в РПА может выступать РНК, что используется при выявлении вирусов с РНК-геномом [3–5].

Аналогом РПА является метод Recombinase Aided Amplification (RAA), отличающийся источником происхождения ферментов [6, 7]. Учитывая общий принцип действия, в дальнейшем будут рассмотрены особенности РПА на основе публикаций по методам РПА и RAA.

Требования, предъявляемые к выбору праймеров и мишени для РПА, существенно отличаются от аналогичных в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Так, размер мишени не должен превышать 500 п.н. Применяются ампликоны как менее 100 п.н., так и значительно большей длины. Оптимальный размер мишени, при котором обеспечивается эффективная амплификация, составляет 100–250 п.н. [8, 9].

В руководстве по РПА [8] описаны следующие характеристики праймеров: рекомендуемая длина

30–35 нуклеотидов, отсутствие однонуклеотидных и SSR-повторов, палиндромов, GC-состав в диапазоне 40–60%, отсутствие вторичных структур, таких как праймер-димеры, шпильки, которые могут привести к артефактам амплификации. Наличие на 3'-конце гуанозина или цитидина повышает производительность праймера. Олигонуклеотиды меньшей длины также могут использоваться для амплификации. Существует ряд публикаций о применении праймеров для ПЦР в РПА, однако считается, что связывание рекомбиназы с короткими праймерами менее эффективно, что сказывается на чувствительности реакции [10, 11]. Большой размер праймеров повышает вероятность образования вторичных структур и димеров, что также нежелательно. В работе N. Sharma и соавт. [12] продемонстрировано использование модифицированных нуклеотидов, которые не связываются между собой, но образуют водородные связи с нуклеотидами матрицы, что позволяет избежать образования артефактных продуктов амплификации. В отличие от ПЦР, при выборе праймеров для РПА не важна расчётная температура их отжига, в требованиях указан диапазон 50–100°C. Ведутся работы по созданию приложений для подбора РПА-праймеров с учётом существующих критериев [13]. Но даже в руководстве по РПА указано, что на данный момент невозможно предсказать эффективность амплификации с конкретными праймерами, поэтому целесообразны выбор нескольких вариантов и их проверка эмпирическим путём [8].

Чувствительность и специфичность

Аналитическая чувствительность и специфичность — это ключевые характеристики любого метода, применяемого для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний. Чувствительность РПА зависит от конкретных праймеров. Как показано в ряде работ [14, 15], в зависимости от расположения праймера на целевой ДНК меняется эффективность амплификации. Длина праймера также имеет большое значение. Так, при проверке различных комбинаций праймеров, незначительно варьируемых по длине, месту отжига и не образующих вторичных структур *in silico*, в ряде случаев ампликоны не образовывались вовсе, либо чувствительность реакции отличалась на несколько порядков [16]. В литературе есть данные о чувствительности РПА, сопоставимой и даже выше, чем в ПЦР [17]. Однако стоит учитывать, что для РПА чувствительность часто считают в числе копий НК, попадающих в реакцию. Это связано с тем, что в стандартном протоколе РПА добавляется всего 1 мкл анализируемой пробы [8], тогда как в ПЦР обычно вносят 5–10 мкл.

Особенностью действия рекомбиназы является её способность распознавать комплементарный

участок, даже если в нём есть однонуклеотидные замены. Биологический смысл данного явления — осуществление репарации повреждённой ДНК. Рекомбиназа распознаёт участки целевой последовательности при наличии в них большого числа замен (до 9) [2]. Как и в ПЦР, наибольшее значение имеет комплементарность нуклеотидов на 3'-конце праймеров, поскольку именно этот участок важен для начала работы полимеразы. С одной стороны, это может быть преимуществом при выборе целевой мишени для вирусных высоковариабельных геномов, с другой стороны, это повышает риск неспецифической амплификации и перекрёстного обнаружения близкородственных видов [18].

Методы детекции

Детекция с помощью электрофореза позволяет оценить результат амплификации по наличию ампликонов специфической длины. В реакционной смеси РПА содержится много белков, большая часть ампликонов после реакции связана с белками и агентами краудинга, что влияет на подвижность ампликонов в геле при электрофорезе и приводит к появлению артефактов на электрофореграмме. Существует несколько способов обработки реакционной смеси для денатурации белков и устранения искажений. Удобным, достаточно эффективным и поэтому часто используемым методом является прогрев при 65°C в течение 10 мин [19]. Иногда для этой цели смесь прогревают при 95°C, возможны обработка детергентом (SDS), ферментативное расщепление (протеиназой K), высокоскоростное центрифугирование [2, 19, 20].

Применение электрофореза в качестве способа детекции результатов РПА нерационально, поскольку занимает больше времени, чем сама реакция, и требует специального оборудования, поэтому обычно используется только на этапе подбора и проверки праймеров.

Детекция с помощью зондов. Флуоресцентно меченные зонды, применяемые в ПЦР, не подходят для РПА: для молекулярных маяков температура реакции является слишком низкой, а отсутствие экзонуклеазной активности *Bsu*-полимеразы не позволяет использовать зонды типа TaqMan. Поэтому для флуоресцентной детекции разработаны специальные зонды и нуклеазы (рис. 3).

При использовании экзонуклеазы III выбирают зонд длиной 45–50 нуклеотидов, в котором флуорофор и гаситель должны быть связаны с тимином на расстоянии примерно 30–40 нуклеотидов от начала и на расстоянии 2–5 нуклеотидов друг от друга. Между флуорофором и гасителем вместо одного из нуклеотидов помещают остаток тетрагидрофурана, который в случае гибридизации зонда разрезается экзонуклеазой, и при этом генерируется флуоресцентный сигнал.

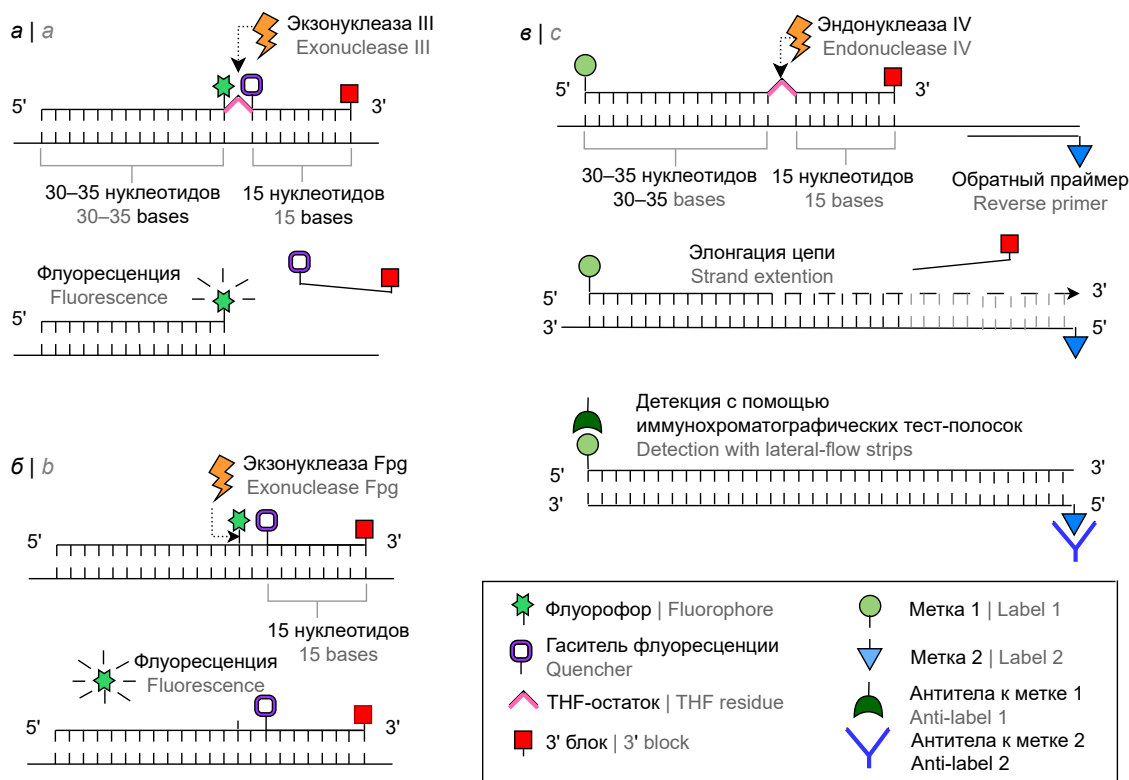


Рис. 3. Структура зондов и принцип детекции при использовании различных типов нуклеаз.

а — экзонуклеаза III; б — экзонуклеаза Fpg; в — эндонуклеаза IV.

Fig. 3. Structure of probes and detection principles with different types of nucleases.

а — exonuclease III; б — exonuclease Fpg; в — endonuclease IV).

Мишенью для экзонуклеазы Fpg служит линкер C-O-C (так называемая dR-группа, например, карбоксифлуоресцеин), с помощью которого флуорофор крепится к зонду. После гибридизации зонда с мишенью Fpg расщепляет dR-остаток, флуорофор освобождается от действия гасителя и испускает флуоресцентный сигнал [2, 8].

Преимуществами флуоресцентной детекции являются высокая скорость получения результата амплификации, точность анализа, отсутствие необходимости дополнительных манипуляций. Однако использование меченых олигонуклеотидов, ферментов и специального оборудования повышает стоимость анализа. Тем не менее данный подход может применяться для одновременной амплификации различных мишеней при проведении РПА в мультиплексном формате [4, 21–23].

Эндонуклеазу IV обычно используют при детекции с помощью иммунохроматографических тест-полосок. Зонд и обратный праймер на 5'-конце содержат различающиеся антигенные метки. Дополнительно в зонд на расстоянии 30–35 нуклеотидов от начала встраивают остаток тетрагидрофурана, который разрезается эндонуклеазой при гибридизации зонда с мишенью, а на 3'-конце — блок, препятствующий неспецифической амплификации. После действия нуклеазы зонд выполняет роль

прямого праймера. В результате амплификации образуется фрагмент, меченный с 2 сторон разными антигенами, который может быть обнаружен посредством иммунохроматографических тест-полосок. Дополнительно для инициации амплификации реакционная смесь может содержать немеченый прямой праймер. В отличие от экзонуклеазы III, которая расщепляет большую долю двухцепочечной ДНК, эндонуклеаза IV действует точнее и не расщепляет ампликоны, поэтому после её использования результат РПА можно проверять методом электрофореза.

Детекция на основе иммунохроматографических тест-полосок отличается быстротой получения результата, простотой проведения, отсутствием необходимости специального оборудования, однако открытие пробирок с ампликонами повышает риск контаминации. Существуют устройства для проведения иммунохроматографического анализа, представляющие собой герметичный картридж, в котором изолированно расположены тест-полоски, что позволяет предотвратить риск контаминации продуктами реакции, но их использование значительно повышает себестоимость каждого теста.

SHERLOCK. Одним из наиболее активно развивающихся методов амплификации НК является «Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter

Unlocking» (SHERLOCK), основанный на сочетании РПА и детекции с помощью системы CRISPR–Cas13 [24]. В методике SHERLOCK после выделения НК проводят изотермическую амплификацию мишени методом РПА или LAMP. Далее T7-транскриптазу применяют для синтеза на основе ампликонов комплементарных РНК. Способность распознавать целевую последовательность и проявлять побочную (неспецифическую) нуклеазную активность Cas13 используют для детекции РНК-мишеней. Специфичность обеспечивается проявлением нуклеазной активности Cas13 только после связи сгРНК и мишени, которая запускает расщепление флуоресцентно меченных репортёрных РНК (короткие РНК, меченные биотином, флуорофором и гасителем). РНК-репортеры служат для усиления сигнала. После их расщепления в результате побочной нуклеазной активности Cas13 образуются фрагменты, меченные биотином и флуорофором, которые можно обнаружить посредством иммунохроматографических тест-полосок. Сочетание Cas13 с Cas12 в одном тесте позволяет одновременно обнаруживать несколько мишеней в рамках одной реакции.

На основе системы CRISPR–Cas разработаны различные диагностические платформы для многих инфекционных патогенов, предложены разнообразные системы пробоподготовки: от применения термического лизиса в качестве экстракции НК до обработки магнитными частицами с целью накопления искомого материала и повышения чувствительности теста [25–27]. По данным публикаций, метод SHERLOCK обладает более высокой чувствительностью по сравнению с аналогичными подходами, предел обнаружения сочетанного использования технологий РПА и CRISPR–Cas составляет несколько копий мишени в реакции [24, 28].

Альтернативные методы детекции результатов РПА. Обнаружение методом флокуляции основано на использовании особых полимеров, которые способствуют связыванию ампликонов, полученных в результате РПА, и магнитных частиц с образованием агрегатов, выпадающих в виде хлопьев, легко различимых невооруженным глазом. Для образования хлопьев важными условиями являются длина НК более 100 нуклеотидов и определённый рН буфера. РПА в сочетании с полимерной флокуляционной седиментацией была предложена J. Hu и соавт. для выявления *Staphylococcus aureus*, чувствительность составила 38 КОЕ/мл [29]. Данный способ относится к детекции по конечной точке, не требует специального оборудования, занимает 10 мин. Однако необходимость выбирать ампликоны длиннее, чем обычно, может негативно отразиться на эффективности амплификации.

В качестве методов детекции результатов РПА также применяют хемилюминесценцию, измере-

ние силы тока в растворе, фотонную детекцию на основе кремниевого микрокольцевого резонатора [30, 31]. На основе электрохимической детекции для обнаружения ДНК HPV16 разработан биосенсор с высокой специфичностью и чувствительностью 0,23 копии/мкл [30]. Поверхностно-усиленная Рамановская спектроскопия позволяет при использовании нескольких репортёрных молекул проводить одномоментный анализ до 5 мишеней [32]. Поскольку данные методы детекции требуют специального оборудования, они не находят широкого применения в практике.

Влияние температуры и перемешивания

В руководстве по РПА рекомендуется температура реакции 37–42°C [8]. Y. Yang и соавт. протестировали широкий диапазон температур — 15–50°C [33]. Установлено, что для успешной амплификации минимальная температура реакции должна быть выше 30°C. В некоторых источниках сообщается о положительном результате РПА при 25°C [34, 35]. Такая относительно низкая температура позволяет отказаться даже от термостата и использовать для поддержания температуры другие источники, например грелку для рук. Z.A. Crannell и соавт. проверяли возможность поддержания постоянной температуры РПА путём инкубирования пробирок на различных участках тела человека [36]. Отмечены высокая чувствительность и стабильность реакции при зажимании пробирок в кулаке.

Развитие диагностики «у постели больного» или возможность применения РПА для самотестирования подразумевает разработку устройства, удобного для применения, с минимальным количеством компонентов и простой техникой проведения. В рамках данного направления несколькими группами учёных [37, 38] были разработаны браслеты на предплечье, в которые вставляется чип или колонки, где проходит реакция. Для детекции предлагают устройство, подключаемое к смартфону. Использование таких браслетов позволяет также с лёгкостью перемешивать реакционную смесь, что значительно влияет на эффективность амплификации.

Буфер, в котором протекает РПА, отличается повышенной вязкостью по сравнению с ПЦР. Многими исследователями показано, что при перемешивании в ходе РПА повышается эффективность амплификации, причем наилучшие результаты получены при постоянном автоматизированном перемешивании, а необходимым минимумом считается дополнительное встряхивание через 4–5 мин после начала реакции. В работе L. Wambua и соавт. без перемешивания положительный флуоресцентный сигнал был получен через 8–14 мин, а при условии перемешивания — в среднем через 5–8 мин [39].

L. Lillis и соавт. продемонстрировали, что уменьшение реакционного объёма с 50 до 5 мкл мо-

жет компенсировать эффект перемешивания [40], поскольку меньший объём увеличивает взаимодействие между реагентами и олигонуклеотидами, необходимыми для амплификации. Уменьшение объёма реакционной смеси также снижает себестоимость реакции.

Влияние ингибиторов

В ряде исследований была показана высокая устойчивость РПА к присутствию ингибиторов. При проведении термического лизиса реакцию можно проводить без полноценного выделения НК из таких образцов, как сыворотка, кал, моча, плевральная жидкость, молоко, почва [17, 27, 41–44]. Продемонстрирована устойчивость к наличию гемоглобина, этанола и гепарина [45]. Тем не менее РПА может подавляться высокими концентрациями геномной ДНК в образцах цельной крови (20–100 нг/мкл). При анализе нативных образцов мочи замечено также снижение чувствительности РПА при низких концентрациях целевой ДНК и внесении мочи в объёме более 5% от общего объёма реакционной смеси [46].

Надёжность РПА в присутствии традиционных ингибиторов позволяет исключить предварительную обработку образца, упрощает анализ и снижает затраты [19]. Стоит отметить, что в некоторых работах наблюдалось снижение чувствительности РПА при прямом исследовании образца [2, 44].

Количественная РПА

Проведение количественного анализа необходимо для оценки уровня экспрессии генов, определения количества вирусной РНК/ДНК в крови с целью прогноза течения заболевания и эффективности лечения. Способ количественной РПА был предложен для выявления *Vibrio mimicus*, вирус иммунодефицита человека и денге [21, 47, 48]. Концентрация ДНК экспоненциально коррелировала с подъёмом кривых флуоресценции в РПА, в экспериментах удалось определить концентрацию опытных образцов с незначительной погрешностью.

В отличие от классической ПЦР в реальном времени, в РПА сложно точно контролировать начальную точку реакции, поскольку РПА инициируется путём добавления ацетата магния, а не повышением температуры реакции. Кроме того, ПЦР синхронизируется в течение каждого цикла, тогда как в РПА отжиг и элонгация происходят параллельно при оптимальной температуре. По этим причинам РПА в реальном времени не считается надёжным средством определения концентрации НК.

Количественный анализ НК возможен с помощью цифровой РПА [49]. Данный метод предполагает фракционирование образца и распределение его в разных разведениях на отсеки объёмом от микро- до пиколитров, в каждом из которых впо-

следствии отдельно происходит амплификация НК. В качестве метода детекции обычно используют флуоресцентные зонды. В конце амплификации подсчёт положительных и отрицательных результатов разных разведений даёт точную, абсолютную количественную оценку исходного количества матрицы нуклеиновой кислоты на основе статистики Пуассона.

Часто цифровую РПА реализуют в формате микрочипов [50–52]. Для одномоментного запуска реакции во всех камерах (лунках) применяются различные подходы. Так, в работе F. Shen и соавт. применили чип, состоящий из 2 планшетов, скользящих относительно друг друга, содержащих различные реагенты для РПА, реакция запускалась при сопоставлении планшетов в определённом положении [50]. В другом микрочипе, состоящем из массива 27 000 пиколитровых лунок (PWA), загрузка образца осуществлялась скребковым лезвием [51]. J.Q. Cui и соавт. разработали технологию PADLOCK (Picoinjection Aided Digital reaction unLOCKing), в которой пикоинъектором в отдельные капли реакционной смеси вносили ацетат магния [52]. В сочетании с детекцией на основе CRISPR/Cas13a методом цифровой капельной РПА авторам удалось обнаруживать отдельные копии НК за 30 мин.

Мультиплексная РПА

Возможность параллельного тестирования нескольких генетических маркеров одновременно предпочтительнее с точки зрения себестоимости и времени анализа. Мультиплексирование удобно при проведении дифференциальной диагностики заболеваний со сходными клиническими симптомами и эпидемиологическим анамнезом.

J. Zhai и соавт. описали способ обнаружения *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* методом РПА с иммунохроматографической детекцией на тест-полосках [53]. Аналитическая чувствительность составила 200 копий на реакцию. Мультиплексную РПА в одной пробирке с электрофоретической детекцией результатов применили для выявления разных штаммов вируса папилломы человека. По сравнению с ПЦР метод показал 100% специфичность, 78% диагностическую точность, 75% чувствительность, но был намного быстрее и дешевле, поэтому авторы предложили использовать его в экспресс-диагностике [54].

В тесте для выявления новой коронавирусной инфекции на основе мультиплексной РПА проводится одновременное обнаружение двух консервативных мишеней SARS-CoV-2 — генов *E* и *RdRP*, что позволяет получать более точные результаты анализа. При флуоресцентной детекции аналитическая чувствительность теста составила 9,5 и 17 копий РНК на реакцию для генов *E* и *RdRP* соответственно. При использовании тест-полосок анали-

тическая чувствительность метода соответствовала 130 копиям РНК на реакцию [4].

Мультиплексная РПА также была предложена для обнаружения бактерий [55, 22], вирусов [56], простейших [57]. Наибольший уровень мультиплексности представлен в работе J. Song и соавт., которые предложили объединить реакции РПА и LAMP на микрочипе. Вначале на этапе РПА проходила одновременная амплификация 16 различных ДНК-мишеней, затем реакционная смесь распределялась между 16 камерами, в которых проходили LAMP и флуоресцентная детекция результатов по отдельности для каждого возбудителя. Такая двухэтапная изотермическая амплификация РПА-LAMP в 16-плексном формате позволила обнаружить до 1 БОЕ штамма вируса Зика [58].

Другим подходом к мультиплексированию является проведение параллельного анализа. Например, разработан подход на основе микрочипа, в котором сначала проводится РПА в отдельных пробирках, а затем продукты амплификации переносят в микрочип, лунки которого покрыты частицами с иммобилизованными квантовыми точками. Удалось добиться одновременной детекции ВИЧ и вируса гепатита В в пределе обнаружения 1000 копий вируса на 1 мл [59].

Для диагностики лихорадки Эбола разработано бумажное микрофлюидное устройство (micro-Paper Analytical Devices — μ PADs), на котором в каплях воска были лиофилизированы компоненты, необходимые для проведения РПА [5]. Для апробации «в полевых условиях» все реактивы помещали в небольшой чемодан, для детекции использовали портативную фотокамеру и 2 светодиода. Далее авторы модифицировали μ PADs, добавив новые точки с лиофилизированными на них праймерами ещё к 2 мишеням. При сопоставлении с ПЦР чувствительность технологии μ PADs составила 90%.

В целом проведение мультиплексной РПА в параллельном формате имеет более высокую производительность анализа, позволяет избежать димеров между олигонуклеотидами и анализировать большее число мишеней по сравнению с постановкой РПА в одной пробирке. Степень мультиплексирования ограничена количеством доступных уникальных меток, используемых для детекции разных мишеней, и размерами реакционной поверхности. Однако в данном случае экономится только время реакции при той же себестоимости, а в некоторых случаях возникает риск контаминации.

Автономные портативные устройства

В последние годы значительное внимание уделяется разработке автономных миниатюрных устройств (микрочипов) для проведения молекулярно-генетических исследований. РПА — наиболее удобный для этой цели метод, поскольку реакция

протекает быстро и при относительно невысокой температуре. Цель разработки микрочипа — интегрировать процессы подготовки пробы, амплификации и детекции в одном устройстве, обычно за счёт микрофлюидики.

D. Liu и соавт. для диагностики новой коронавирусной инфекции разработали микрочип на основе микрофлюидных технологий [60], который объединил РПА с обратной транскрипцией (ОТ-РПА) и систему детекции на основе иммунохроматографических тест-полосок. Разработанная система показала предел обнаружения, равный 1 копии/мкл или 30 копиям на образец, при проверке клинических образцов диагностическая чувствительность составила 97%, а специфичность — 100%, что сопоставимо с характеристиками ОТ-ПЦР. При решении аналогичной задачи другими авторами было создано устройство в форме ручки, совмещающее модули амплификации, иммунохроматографической детекции и герметизации [61].

Для обнаружения SARS-CoV-2 предложен чип на основе центробежной микрофлюидики, сочетающий ОТ-РПА и флуоресцентную детекцию по конечной точке [62]. Микрофлюидный чип в форме предметного стекла для микроскопа позволял одновременно обнаруживать наличие 3 вирусных мишеней и 1 мишень ДНК человека за 30 мин. Чувствительность составила 40 копий РНК на реакцию для гена *E*, 20 копий — для гена *N*, 10 копий — для гена *ORF1ab*. Альтернативный вариант микрочипа, объединяющий все этапы анализа, основан на очистке образца с помощью магнитных частиц и РПА с флуоресцентной детекцией. Его применение обеспечивало выявление РНК SARS-CoV-2 за 37 мин с чувствительностью 10 копий/мл [63].

В целом разработка интегрированных систем анализа на основе РПА, позволяющих исследовать образец без дополнительных этапов пробоподготовки до этапа получения результата, направлена на обеспечение портативности данного метода, проведения диагностики «у постели больного» и даже для самотестирования. Однако ускоренные методы экстракции НК не подходят для некоторых видов биологического материала, например цельной крови или секционного материала.

Заключение

Идеальный метод выявления возбудителей инфекционных заболеваний должен быть специфичным, чувствительным, быстрым и экономически выгодным. Оценивать чувствительность и специфичность РПА в целом довольно трудно, поскольку данные параметры сильно зависят от выбора конкретных праймеров и способа детекции результатов. Не существует надежных критериев и программного обеспечения, гарантирующих высокую эффективность РПА, что затрудняет разработку но-

вых тест-систем. Специфичность РПА теоретически может быть ниже, чем у ПЦР, за счёт устойчивости рекомбиназы к однонуклеотидным заменам, но большая длина праймеров в РПА частично нивелирует этот недостаток. Чувствительность РПА сопоставима с ПЦР и достигает нескольких копий ДНК/РНК на реакцию, однако может превышать 100 копий на реакцию.

РПА отличается самой высокой скоростью получения результата. При условии перемешивания реакционной смеси и флуоресцентной детекции положительные результаты регистрируют через 5–10 мин. Изотермичность реакции в сочетании с температурным оптимумом в 37–40°C позволяют не только отказаться от термоциклеров, но и использовать для инкубации тепло человеческого тела, что может быть актуальным для диагностики в «полевых» условиях. Несомненным достоинством метода является устойчивость РПА к ряду ингибиторов, которая дает возможность исключить этап выделения НК при исследовании большинства типов образцов, что снижает время проведения и общую стоимость анализа. С другой стороны, себестоимость реакционной смеси РПА выше, чем ЛАМР и ПЦР, за счёт большего числа ферментов и компонентов реакции.

На сегодняшний день технология РПА, в отличие от ЛАМР, защищена патентом, что препятствует ее широкому внедрению в лабораторную диагностику. Наиболее перспективными направлениями развития данного метода, на наш взгляд, является сочетание РПА с детекцией на основе CRISPR–Cas, обеспечивающее высокую чувствительность, а также разработка портативных устройств, объединяющих все этапы анализа и подходящих для экспресс-диагностики.


СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006;4(7):204.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- Li J., Macdonald J., von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst.* 2018;144(1):31–67.
DOI: <https://doi.org/10.1039/C8AN01621F>
- Juma K.M., Takita T., Ito K., et al. Optimization of reaction condition of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA and RNA using a statistical method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021;567:195–200.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.06.023>
- Cherkaoui D., Huang D., Miller B.S., et al. Harnessing recombinase polymerase amplification for rapid multi-gene detection of SARS-CoV-2 in resource-limited settings. *Biosens. Bioelectron.* 2021;189:113328.
DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.21251732>
- Magro L., Jacquelin B., Escadafal C., et al. Paper-based RNA detection and multiplexed analysis for Ebola virus diagnostics. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1347.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00758-9>
- Zhang X., Guo L., Ma R., et al. Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification. *J. Microbiol. Methods.* 2017;139:202–4.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.011>
- Chen W., Fan J., Li Z., et al. Development of recombinase aided amplification combined with disposable nucleic acid test strip for rapid detection of porcine circovirus type 2. *Front. Vet. Sci.* 2021;8:676294.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.676294>
- TwistAmp® DNA Amplification Kits: Combined Instruction Manual.
URL: https://www.twistdx.co.uk/wp-content/uploads/2021/04/ta01cmanual-combined-manual_revo_v1-3b.pdf
- Salazar A., Ochoa-Corona F.M., Talley J.L., et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) with lateral flow detection for three *Anaplasma* species of importance to livestock health. *Sci. Rep.* 2021;11:15962.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95402-y>
- Fuller S.L., Savory E.A., Weisberg A.J., et al. Isothermal amplification and lateral-flow assay for detecting crown-gall-causing *Agrobacterium* spp. *Phytopathology.* 2017;107(9):1062–8.
DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-17-0144-R>
- Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A., Maquieira Á. Low-cost genotyping method based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric microarray detection. *Microchim. Acta.* 2017;184:1453–62.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2144-0>
- Sharma N., Hoshika S., Hutter D., et al. Recombinase-based isothermal amplification of nucleic acids with self-avoiding molecular recognition systems (SAMRS). *Chembiochem.* 2014;15(15):2268–74.
DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.201402250>
- Higgins M., Ravenhall M., Ward D., et al. PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays. *Bioinformatics.* 2019;35(4):682–4.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701>
- Li J.S., Hao Y.Z., Hou M.L., et al. Development of a recombinase-aided amplification combined with lateral flow dipstick assay for the rapid detection of the African swine fever virus. *Biomed. Environ. Sci.* 2022;35(2):133–40.
DOI: <https://doi.org/10.3967/bes2022.018>
- Patchesung M., Jantarug K., Pattama A., et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat. Biomed. Eng.* 2020;4(12):1140–9.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00603-x>
- Naveen K.P., Bhat A.I. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and reverse transcription recombinase polymerase amplification (RT-RPA) assays for the detection of two novel viruses infecting ginger. *J. Virol. Methods.* 2020;282:113884.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113884>
- Shen X.X., Qiu F.Z., Shen L.P., et al. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction. *BMC Infect. Dis.* 2019;19(1):229.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3814-9>
- Patel P., Abd El Wahed A., Faye O., et al. A field-deployable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the Chikungunya virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(9):e0004953.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004953>
- Londono M.A., Harmon C.L., Polston J.E. Evaluation of recombinase polymerase amplification for detection of begomoviruses by plant diagnostic clinics. *Virol. J.* 2016;13:48.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0504-8>
- Babu B., Washburn B.K., Miller S.H., et al. A rapid assay for detection of Rose rosette virus using reverse transcription-recombinase polymerase amplification using multiple gene targets. *J. Virol. Methods.* 2017;240:78–84.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.11.014>

21. Crannell Z.A., Rohrman B., Richards-Kortum R. Quantification of HIV-1 DNA using real-time recombinase polymerase amplification. *Anal. Chem.* 2014;86(12):5615–9. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac5011298>
22. Conrad C.C., Daher R.K., Stanford K., et al. Sensitive and accurate recombinase polymerase amplification assay for detection of the primary bacterial pathogens causing bovine respiratory disease. *Front. Vet. Sci.* 2020;7:208. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00208>
23. Guo M., Feng P., Zhang L., et al. Rapid detection of *Clostridium tetani* by recombinase polymerase amplification using an exo probe. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2022;32(1):91–8. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.2109.09022>
24. Zahra A., Shahid A., Shamim A., et al. The SHERLOCK platform: an insight into advances in viral disease diagnosis. *Mol. Biotechnol.* 2023;65(5):699–714. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00625-7>
25. Arizti-Sanz J., Bradley A., Zhang Y.B., et al. Simplified Cas13-based assays for the fast identification of SARS-CoV-2 and its variants. *Nat. Biomed. Eng.* 2022;6(8):932–43. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00889-z>
26. Joung J., Ladha A., Saito M., et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(15):1492–4. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2026172>
27. Zhang J.X., Xu J.H., Yuan B., et al. Detection of *Burkholderia pseudomallei* with CRISPR-Cas12a based on specific sequence tags. *Front. Public Health.* 2023;11:1153352. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1153352>
28. Волков А.А., Долгова А.С., Дедков В.Г. Молекулярные диагностические платформы, созданные на базе систем CRISPR/Cas. *Инфекция и иммунитет.* 2022;12(1):9–20. Volkov A.A., Dolgova A.S., Dedkov V.G. CRISPR/Cas-based diagnostic platforms. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2022;12(1):9–20. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CCB-1843>. EDN: <https://elibrary.ru/fdhjgz>
29. Hu J., Wang Y., Ding H., et al. Recombinase polymerase amplification with polymer flocculation sedimentation for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 2020;331:108691. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108691>
30. Nakowong P., Chatchawal P., Chaibun T. Detection of high-risk HPV 16 genotypes in cervical cancers using isothermal DNA amplification with electrochemical genosensor. *Talanta.* 2024;269:125495. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125495>
31. Dao T.N.T., Lee E.Y., Koo B., et al. A microfluidic enrichment platform with a recombinase polymerase amplification sensor for pathogen diagnosis. *Anal. Biochem.* 2018;544:87–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.030>
32. Zhuang J., Zhao Z., Lian K., et al. SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods. *Biosens. Bioelectron.* 2022;207:114167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114167>
33. Yang Y., Qin X., Wang G., et al. Development of an isothermal amplification-based assay for rapid visual detection of an Orf virus. *Viral. J.* 2016;13:46. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0502-x>
34. Poulton K., Webster B. Development of a lateral flow recombinase polymerase assay for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections. *Anal. Biochem.* 2018;546:65–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.031>
35. Wang F., Liang Q., Lv R., et al. Optimization and validation of reverse transcription recombinase-aided amplification (RT-RAA) for *Sorghum mosaic virus* detection in sugarcane. *Pathogens.* 2023;12(8):1055. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12081055>
36. Crannell Z.A., Rohrman B., Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. *PLoS One.* 2014;9(11):e112146. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112146>
37. Kong M., Zihan L.I., Wu J., et al. A wearable microfluidic device for rapid detection of HIV-1 DNA using recombinase polymerase amplification. *Talanta.* 2019;205:120155. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120155>
38. Trinh K.T.L., Lee N.Y. Fabrication of wearable PDMS device for rapid detection of nucleic acids via recombinase polymerase amplification operated by human body heat. *Biosensors (Basel).* 2022;12(2):72. DOI: <https://doi.org/10.3390/bios12020072>
39. Wambua L., Schneider B., Okwaro A., et al. Development of field-applicable tests for rapid and sensitive detection of *Candidatus Phytoplasma oryzae*. *Mol. Cell. Probes.* 2017;35:44–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.06.004>
40. Lillis L., Siverson J., Lee A., et al. Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Mol. Cell Probes.* 2016;30(2):74–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.009>
41. Liu Y., Xiang J., Gao Y., et al. Rapid detection of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic cattle feces by isothermal recombinase polymerase amplification assays. *Heliyon.* 2023;9(10):e20794. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20794>
42. Balea R., Pollak N.M., Hobson-Peters J., et al. Development and pre-clinical evaluation of a Zika virus diagnostic for low resource settings. *Front. Microbiol.* 2023;14:1214148. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1214148>
43. Choi G., Jung J.H., Park B.H., et al. A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) micro-device for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria. *Lab. Chip.* 2016;16(12):2309–16. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6LC00329J>
44. Wu Y.D., Zhou D.H., Zhang L.X., et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for equipment-free detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy cattle feces. *Parasitol. Res.* 2016;115(9):3551–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5120-4>
45. Kersting S., Rausch V., Bier F.F., von Nickisch-Rosenegk M. Rapid detection of Plasmodium falciparum with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malar J.* 2014;13:99. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-99>
46. Rosser A., Rollinson D., Forrest M., Webster B.L. Isothermal Recombinase Polymerase amplification (RPA) of *Schistosoma haematobium* DNA and oligonucleotidographic lateral flow detection. *Parasit. Vector.* 2015;8:446. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1055-3>
47. Zhu P., Huang Z., Xiong Z., et al. Development and evaluation of real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid and sensitive detection of *Vibrio mimicus* in human plasma samples. *J. Appl. Microbiol.* 2022;133(3):1650–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15666>
48. Valloly P., Roy R. Nucleic acid quantification with amplicon yield in recombinase polymerase amplification. *Anal. Chem.* 2022;94(40):13897–905. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02810>
49. Choi J.W., Seo W.H., Kang T., et al. Droplet digital recombinase polymerase amplification for multiplexed detection of human coronavirus. *Lab. Chip.* 2023;23(10):2389–98. DOI: <https://doi.org/10.1039/d3lc00025g>
50. Shen F., Davydova E.K., Du W., et al. Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip. *Anal. Chem.* 2011;83(9):3533–40. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac200247e>
51. Li Z., Liu Y., Wei Q., et al. Picoliter well array chip-based digital recombinase polymerase amplification for absolute

- quantification of nucleic acids. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0153359. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153359>
52. Cui J.Q., Liu F.X., Park H., et al. Droplet digital recombinase polymerase amplification (ddRPA) reaction unlocking via picoinjection. *Biosens. Bioelectron.* 2022;202:114019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114019>
 53. Zhai J., Wang L., Qiao X., et al. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in pregnant women by multiplex recombinase polymerase amplification. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251119. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251119>
 54. Wongsamart R., Bhattarakasol P., Chaiwongkot A., et al. Multiplex recombinase polymerase amplification for high-risk and low-risk type HPV detection, as potential local use in single tube. *Sci. Rep.* 2023;13(1):829. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28038-9>
 55. Лапа С.А., Суржиков С.А., Благодатских С.А. и др. Рекомбиназная полимеразная амплификация для быстрого выявления возбудителей бактериальной пневмонии человека. *Молекулярная биология*. 2023;57(3):539–45. Lapa S.A., Surzhikov S.A., Blagodatskikh S.A., et al. Recombinase polymerase amplification for rapid detection of human bacterial pneumonia pathogens. *Molecular Biology*. 2023;57(3):539–45. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0026898423030072> EDN: <https://elibrary.ru/chgyqf>
 56. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Multiplex assay of viruses integrating recombinase polymerase amplification, barcode — anti-barcode pairs, blocking anti-primers, and lateral flow assay. *Anal. Chem.* 2021;93(40):13641–50. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03030>
 57. Crannell Z., Castellanos-Gonzalez A., Nair G., et al. Multiplexed recombinase polymerase amplification assay to detect intestinal protozoa. *Anal. Chem.* 2016;88(3):1610–6. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03267>
 58. Song J., Liu C., Mauk M.G., et al. Two-stage isothermal enzymatic amplification for concurrent multiplex molecular detection. *Clin. Chem.* 2017;63(3):714–22. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.263665>
 59. Ming K., Kim J., Biondi M.J., et al. Integrated quantum dot barcode smartphone optical device for wireless multiplexed diagnosis of infected patients. *ACS Nano*. 2015;9(3):3060–74. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn5072792>
 60. Liu D., Shen H., Zhang Y., et al. A microfluidic-integrated lateral flow recombinase polymerase amplification (MI-IF-RPA) assay for rapid COVID-19 detection. *Lab. Chip*. 2021;21(10):2019–26. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0LC01222J>
 61. Fu Q., Tu Y., Cheng L., et al. A fully-enclosed prototype 'pen' for rapid detection of SARS-CoV-2 based on RT-RPA with dipstick assay at point-of-care testing. *Sens. Actuators B Chem.* 2023;383:133531. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133531>
 62. Li R., Su N., Ren X., et al. Centrifugal microfluidic-based multiplex recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of SARS-CoV-2. *iScience*. 2023;26(3):106245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106245>
 63. Seder I., Coronel-Tellez R., Helalat S.H., Sun Y. Fully integrated sample-in-answer-out platform for viral detection using digital reverse transcription recombinase polymerase amplification (dRT-RPA). *Biosens. Bioelectron.* 2023;237:115487. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115487>

Информация об авторах

Бондарева Ольга Сергеевна  — к.м.н., с.н.с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского НИПЧИ, Волгоград, Россия, bondareva0s@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>


Батурин Артем Александрович — н.с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского НИПЧИ, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Миронова Анна Владимировна — н.с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского НИПЧИ, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6958-7861>

Участие авторов. **Бондарева О.С.** — написание текста статьи; **Батурин А.А., Миронова А.В.** — сбор и анализ источников, редактирование текста публикации. 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 29.02.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Olga S. Bondareva  — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, bondareva0s@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Artem A. Baturin — researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Anna V. Mironova — researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6958-7861>

Author contribution. **Bondareva O.S.** — writing the text of the article; **Baturin A.A., Mironova A.V.** — collection and analysis of sources, editing the text of the publication. All authors made 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. 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 29.02.2024;
published 29.04.2024



Поддесневой микробиом при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (метаанализ)

Царева Т.В., Балмасова И.П., Царев В.Н.✉

Российский университет медицины, Москва, Россия

Аннотация

Проблема хронического пародонтита (ХП) активно обсуждается в связи с признанием того факта, что микробное поражение пародонта тесно связано с рядом системных заболеваний и, вероятно, играет важную роль в возникновении коморбидной патологии.

Цель метаанализа — характеристика состава поддесневого микробиома и определение особенностей формирования ассоциаций нового пародонтопатогена *Filifactor alocis* с другими пародонтопатогенными бактериями I и II порядка, а также комменсальными бактериями, колонизирующими данный биотоп.

В исследовании представлены данные обследования пациентов с обязательным использованием методов полимеразной цепной реакции и секвенированием генов 16S рРНК у 1529 здоровых лиц и 2394 пациентов с ХП, 136 человек с ассоциацией ХП и атеросклероза, 258 человек с ассоциацией ХП и сахарного диабета 2-го типа. Подтверждено, что основу орального микробиома в норме составляют представители микроаэрофильных стрептококков, коринебактерий, лактобацилл, а также представителей родов *Veillonella* и *Sphingobacterium*. Проведённое 16S-секвенирование и биоинформационный анализ позволили конкретизировать таксономическое место нового возбудителя *F. alocis*, а также представителей нормобиоты при ХП и коморбидной соматической патологии.

Ключевые слова: пародонтит, сахарный диабет 2-го типа, атеросклероз, поддесневой микробиом, *Filifactor alocis*, ПЦР, 16S-секвенирование

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: Царева Т.В., Балмасова И.П., Царев В.Н. Поддесневой микробиом при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (метаанализ). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024;101(2):281–292.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-500>

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

Subgingival microbiome in periodontal disease and comorbid pathology (meta-analysis)

Tatyana V. Tsareva, Irina P. Balmasova, Viktor N. Tsarev✉

Russian University of Medicine, Moscow, Russia

Abstract

The problem of chronic periodontitis (CP) is actively discussed due to the recognition of the fact that periodontal microbial damage is closely related to a number of systemic diseases and probably plays an important role in the occurrence of comorbid pathology.

The aim of the meta-analysis was to characterize the composition of the subgingival microbiome and to determine the peculiarities of the formation of associations of the new periodontal pathogen *Filifactor alocis* with other I and II order periodontal pathogenic bacteria, as well as with the commensal bacteria colonizing this biotope.

The study presents data of patient examination with obligatory use of polymerase chain reaction methods and sequencing of 16S rRNA genes in 1529 healthy individuals and 2394 patients with CP, 136 patients with CP and concomitant atherosclerosis, 258 patients with CP and concomitant type 2 diabetes mellitus. It was confirmed that the basis of the oral microbiome under normal circumstances is composed of representatives of microaerophilic

streptococci, corynebacteria, lactobacilli, as well as representatives of the *Veillonella* and *Sphingobacterium* genera. 16S sequencing and bioinformatic analysis allowed us to specify the taxonomic place of the new pathogen *F. alocis*, as well as representatives of normal microbiota in CP and comorbid somatic pathology.

Keywords: Periodontitis, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, subgingival microbiome, *Filifactor alocis*, PCR, 16S sequencing

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: Tsareva T.V., Balmasova I.P., Tsarev V.N. Subgingival microbiome in periodontal disease and comorbid pathology (meta-analysis). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):281–292.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-500>

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

Введение

Хронический генерализованный пародонтит (ХП) — тяжёлое поражение дёсен и подлежащих тканей пародонта с рецидивирующим течением, которое является основной причиной утраты зубов в среднем и пожилом возрасте. По распространённости эта патология — ведущая стоматологическая проблема в мире среди взрослого работоспособного населения, хотя выявлены существенные вариации частоты в зависимости от возраста, региона, климатических и социальных условий (частота варьирует от 60 до 90%) [1–3]. Социально-медицинское значение проблемы ХП постоянно увеличивается, в том числе в связи с ростом заболевания агрессивным пародонтитом, развивающимся в молодом возрасте [4, 5]. Проблема ХП активно обсуждается на различных конгрессах, проводимых под эгидой ВОЗ, в связи с признанием того факта, что микробное поражение пародонта тесно связано с рядом системных заболеваний и, вполне вероятно, играет важную роль в возникновении коморбидной патологии [5–7].

Способность микроорганизмов колонизировать слизистую оболочку рта, ткани пародонта и поверхности зубных рядов с формированием многокомпонентной структурированной микробной биоплёнки чрезвычайно важна с биологической точки зрения. Бактерии осуществляют многочисленные метаболические, барьерные и протективные функции, способствуют целостности тканей пародонта, увеличивают пролиферацию клеток эпителия, готовят барьер слизистой оболочки к потенциальной агрессии патогенов за счёт выработки антимикробных пептидов и цитокинов [6].

Ключевым моментом развития инфекционного-воспалительного поражения тканей пародонта является колонизация микробной биоплёнки приоритетными патогенами, способными к внутриклеточному паразитизму и получившими название пародонтопатогенных. Локализация этой биоплёнки — область зубо-десневой борозды, а по мере прогрессирования деструктивного процесса — в формирующемся пародонтальном кармане [8, 9].

Таким образом, речь идёт о поддесневом микробиоме, формирующемся при колонизации биоплёнки как представителями нормобиоты, так и пародонтопатогенными видами бактерий.

В 1998 г. S.S. Socransky и соавт. предложили классификацию, основанную на изучении степени частоты определения представителей микрофлоры в очаге воспаления: выделены «красный», «оранжевый» и другие комплексы, а также в большей степени представляющие нормальную и транзиторную микрофлору — «жёлтый», «зелёный», «фиолетовый». К «красному» комплексу, в частности, отнесены *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (по старой номенклатуре — *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola* [10]. Однако в настоящее время эта классификация больше имеет историческое значение, т. к. некоторые возбудители агрессивного пародонтита, например токсигенный серотип *b* актинобациллы *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, были описаны несколько позже [11].

В отечественной литературе после I Съезда пародонтологов России в 2005 г. впервые было введено понятие о пародонтопатогенных бактериях I порядка, которые обладают сочетанием трёх ведущих признаков: вертикальная и горизонтальная передача инфекционного агента от человека к человеку, способность к внутриклеточному паразитизму, а также токсигенность (имеется в виду, прежде всего, продукция экзотоксинов), в отличие от пародонтопатогенов II порядка, которые не имеют полного набора этих признаков. К пародонтопатогенным видам I порядка были отнесены три возбудителя: *P. gingivalis*, *T. forsythia* и *A. actinomycetemcomitans*, токсигенный серотип *b* [8, 9, 12]. В дальнейших исследованиях были установлены диагностически значимые показатели микробного числа для разных видов пародонтопатогенных бактерий I и II порядков, которые с некоторыми коррективами представлены в **табл. 1**.

При развитии заболеваний пародонта довольно часто формируются синергические и/или мутуалистические взаимодействия между оральными

Таблица 1. Количественные параметры содержания пародонтопатогенных бактерий I и II порядков в биоплёнке десны в норме [6, 13]

Table 1. Quantitative parameters of the content of periodontal pathogenic bacteria of I and II orders in the gingival biofilm under normal circumstances [6, 13]

Группа пародонтопатогенов Periodontal pathogen group	Признаки группы Group traits	Виды пародонтопатогенов Periodontal pathogen type	Количество, КОЕ/мл Quantity, CFU/ml
Пародонтопатогенные виды I порядка Periodontal pathogenic species of the I order	Представители данных видов являются возбудителями пародонтита; в норме у здорового человека отсутствуют (за исключением случаев «здорового носительства» в 6–12% случаев) Representatives of these species are pathogens of periodontitis; normally absent in a healthy person (except for healthy carriage in 6–12% of cases)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	> 10 ²
		<i>B. (Tannerella) forsythia</i>	> 10 ²
		<i>P. gingivalis</i>	> 10 ²
Пародонтопатогенные виды II порядка Periodontal pathogenic species of the II order	Представители данных видов на дёснах в норме отсутствуют или определяются в малом количестве. Превышение указанного количества — признак развития пародонтита Representatives of these species on the gums are normally absent or determined in small numbers. Exceeding the specified number is a sign of periodontitis development	<i>Prevotella intermedia</i>	> 10 ²
		<i>Treponema denticola</i>	> 10 ³
		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	> 10 ³
		<i>Filifactor alocis</i>	> 10 ³
		<i>Actinomyces israelii</i>	> 10 ⁴
		<i>Parvimonas micros</i>	> 10 ⁴
		<i>Streptococcus intermedius</i>	> 10 ⁴
		<i>Eykenella corrodens</i>	> 10 ³
		<i>Selenomonas</i> spp.	> 10 ³
		<i>Wolinella recta</i>	> 10 ³
<i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i>	> 10 ²		

патогенами (пародонтопатогенами), которые, как считается, способствуют возникновению и прогрессированию заболевания. Однако не следует забывать, что в основе таких взаимоотношений лежит потенцирование действия их факторов вирулентности как возбудителей инфекционного процесса [6, 13]. И если этиологическая роль *P. gingivalis* как ключевого пародонтопатогена сомнению не подвергается [14], то значение некоторых других труднокультивируемых бактерий, которые начали изучаться по данным современных молекулярных методов исследований, остаётся предметом дискуссий [15–17].

Одним из таких микробов, по-видимому, является *Filifactor alocis*, относительно недавно выделенный из класса *Fusobacteria*, типа *Firmicutes* в отдельный род, представленный единственным видом. Как подчёркивают Е. Ажа и соавт., *F. alocis* является новым членом микробиома пародонта и в настоящее время предлагается использовать его в качестве диагностического индикатора заболеваний пародонта [18]. Однако из-за отсутствия генетических инструментов для изучения этого микроорганизма до последнего времени мало известно о его характеристиках и вирулентности, а значение при коморбидной патологии описано в единичных публикациях [19]. Это обстоятельство побудило нас в недавно проведённых исследованиях к созданию диагностического набора праймеров и зондов для мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для детекции данного вида пародонтопато-

генных бактерий [20, 21]. С другой стороны, очевидна необходимость анализа имеющихся данных о составе и взаимоотношениях компонентов поддесневого микробиома.

Целью метаанализа являлись характеристика состава поддесневого микробиома и определение особенностей формирования ассоциаций нового пародонтопатогена *F. alocis* с другими пародонтопатогенными бактериями I и II порядков, а также комменсальными бактериями, колонизирующими данный биотоп.

Материалы и методы

Поиск проводили в базах данных MEDLINE (через PubMed), EMBASE и Cochrane Library с 2005 г. до октября 2023 г. по ключевым словам, обозначенным в цели исследования, с использованием стратегии поиска, соответствующей разработанным критериям включения в исследование и исключения из него.

Критерии включения:

1) исследования микробиома с использованием секвенирования генов 16S рРНК бактерий, включая метаанализы и систематические обзоры, в которых сравнивались результаты, полученные микробиологическими и молекулярно-биологическими методами (проценты встречаемости типов, родов, видов бактерий), в образцах поддесневого налета пациентов:

- системно здоровых, без явлений пародонтита (группа контроля);

- с ХП без системной патологии;
- с ХП при сопутствующем верифицированном атеросклерозе (АТ);
- с ХП при сопутствующем верифицированном сахарном диабете 2-го типа (СД2);

2) учитывали только исследования с указанием на выявление в составе микробиома относительно нового труднокультивируемого пародонтопатогенного вида — *F. alocis*.

Критерии исключения:

- исследования, опубликованные на других языках, кроме русского или английского;
- отсутствие первичных данных;
- отсутствие данных по образцам из зубодесневой борозды системно здоровых людей в группах пародонтально здоровых и/или из пародонтальных карманов глубиной 5 мм и более в группах больных ХП, в том числе с сопутствующей патологией;
- исследования, в которых оценивали только состояние пациентов с гингивитом без признаков пародонтита, с агрессивным или рефрактерным пародонтитом.

В ходе поиска было найдено в общей сложности 1437 исследований. После титульного скрининга 1211 работ были исключены, а 126 были отобраны. После прочтения рефератов 12 исследований были исключены, а 114 полнотекстовых публикаций подверглись всесторонней оценке. После ознакомления с этими исследованиями 92 были исключены за несоответствие критериям включения. Таким образом, в данное исследование были включены результаты из 22 источников литературы.

Результаты

После получения соответствующего массива проводили извлечение данных с обозначением следующей дополнительной информации:

- место проведения исследования;
- характеристики участников (по клиническому состоянию пародонта и наличию коморбидной патологии);
- тип микробиологической оценки (метод исследования);
- микробиологические результаты (в процентах) по отдельным таксонам бактерий в разных группах исследования.

Типы, роды, виды бактерий впоследствии были проиндексированы в соответствии с таксономическим указателем Национального центра биотехнологической информации США¹.

Методические особенности, год и место выполнения исследований в использованных для

метаанализа источниках литературы обобщены и представлены в **табл. 2**.

Среди источников литературы, вошедших в исследование, было 2 систематических обзора с указанием объединённых из нескольких источников числовых данных, а остальные источники содержали результаты оригинальных исследований. Количественные данные, использованные при проведении метаанализа, содержались либо в составе графического материала, либо в виде дополнительной информации к публикации.

Обобщённая характеристика контингентов лиц, подвергнутых анализу по результатам оригинальных исследований, представлена в **табл. 3**. Число обследованных здоровых лиц и пациентов, страдающих ХП, содержалось в 16 и 12 источниках соответственно и было довольно значимым (1529 и 2394 человек). Что касается групп пациентов с ХП, ассоциированным с системными патологическими процессами, то условиям поиска удовлетворяли только 6 источников, содержащих данные по составу субгингивального микробиома у 136 человек с ассоциацией ХП и АТ, и 6 источников по результатам аналогичных исследований, в которых анализировались данные 258 человек с ассоциацией ХП и СД2.

Особенностью сравнительных данных, содержащихся во всех 6 источниках по ассоциации ХП и АТ, является изучение не только субгингивального микробиома, но и таксономического состава бактерий, обнаруженных в АТ-бляшках стенок сосудов, удалённых хирургическим путём в процессе оказания как экстренной, так и плановой помощи пациентам.

Так, не только метагеномными методами, но и с помощью ПЦР было установлено, что пародонтопатогенные бактерии I порядка, относящиеся к видам *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *T. forsythia*, были обнаружены более чем в 60% образцов, полученных после эндартериэктомии у испанских пациентов [43]. Однако данные ПЦР тромбов японских пациентов с острым инфарктом миокарда показали, что среди пародонтопатогенов наиболее распространённым организмом был *A. actinomycetemcomitans*, обнаруженный примерно в 20% образцов [44].

Кроме этого, АТ-бляшки содержали *Acinetobacter* (39%), *Chryseobacterium* (9%), *Rhizobium* (5%) и *Staphylococcus* (4%). Сравнение этого микробиома с субгингивальной микробиотой показало, что 22 бактериальных рода были общими для двух разных локусов, при этом *Acinetobacter* оказался доминирующим [40].

Ещё в одном исследовании бактериальная ДНК была обнаружена в 12 образцах при эндартериэктомии (34,3%). Идентифицировано 23 вида/филотипа бактерий. Протеобактерии и фирмику-

¹ National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

Таблица 2. Сведения об особенностях исследований, включённых в метаанализ
Table 2. Information about the characteristics of the studies included in the meta-analysis

Тип исследования Study type	Страна Country	Группа исследования Study group	<i>n</i>	Источник Source
Оригинальное Original	США USA	Здоровые лица Healthy patients	15	[22]
		Пациенты с ХП Patients with CP	15	
Оригинальное Original	США USA	Здоровые лица Healthy patients	29	[23]
		Пациенты с ХП Patients with CP	29	
Оригинальное Original	США USA	Здоровые лица Healthy patients	5	[24]
		Пациенты с ХП Patients with CP	2	
Оригинальное Original	США, Чили USA, Chile	Здоровые лица Healthy patients	10	[2]
		Пациенты с ХП Patients with CP	22	
Систематический обзор Systemic review	США USA	Здоровые лица Healthy patients	98	[25]
		Пациенты с ХП Patients with CP	24	
Оригинальное Original	Бразилия, Канада Brazil, Canada	Пациенты с ХП и АТ Patients with CP and AT	18	[26]
Оригинальное Original	Бразилия Brazil	Здоровые лица Healthy patients	27	[27]
		Пациенты с ХП Patients with CP	59	
Оригинальное Original	Бразилия Brazil	Здоровые лица Healthy patients	912	[28]
		Пациенты с ХП Patients with CP	1918	
Оригинальное Original	Корея Korea	Здоровые лица Healthy patients	12	[29]
		Пациенты с ХП Patients with CP	10	
Оригинальное Original	Россия Russia	Пациенты с ХП и АТ Patients with CP and AT	28	[30]
Оригинальное Original	США USA	Здоровые лица Healthy patients	76	[31]
		Пациенты с ХП Patients with CP	76	
Оригинальное Original	США, Индия USA, India	Здоровые лица Healthy patients	75	[32]
		Пациенты с ХП Patients with CP	50	
		Пациенты с ХП и СД2 Patients with CP and T2D	50	
Оригинальное Original	США USA	Здоровые лица Healthy patients	97	[33]
		Пациенты с ХП и СД2 Patients with CP and T2D	98	
Оригинальное Original	Бразилия, США Brazil, USA	Здоровые лица Healthy patients	98	[34]
		Здоровые лица Healthy patients	59	
		Пациенты с ХП Patients with CP	67	
Оригинальное Original	Мексика Mexico	Пациенты с ХП и СД2 Patients with CP and T2D	38	[35]
		Здоровые лица Healthy patients	19	
Оригинальное Original	Саудовская Аравия Saudi Arabia	Пациенты с ХП и СД2 Patients with CP and T2D	15	[36]
		Здоровые лица Healthy patients	32	
Оригинальное Original	Южная Африка South Africa	Пациенты с ХП Patients with CP	32	[37]
		Пациенты с ХП и СД2 Patients with CP and T2D	32	
		Здоровые лица Healthy patients	16	
Оригинальное Original	Россия Russia	Пациенты с ХП Patients with CP	15	[21]
		Пациенты с ХП и СД2 Patients with CP and T2D	15	
		Здоровые лица Healthy patients	10	
Оригинальное Original	Тунис Tunisia	Пациенты с ХП и АТ Patients with CP and AT	20	[38]
		Здоровые лица Healthy patients	15	
Оригинальное Original	Италия Italy	Пациенты с ХП и АТ Patients with CP and AT	15	[39]
		Здоровые лица Healthy patients	15	
Оригинальное Original	Индия India	Пациенты с ХП и АТ Patients with CP and AT	12	[40]
Оригинальное Original	Япония Japan	Пациенты с ХП и АТ Patients with CP and AT	43	[41]

Примечание. Во всех исследованиях проведено секвенирование генов 16S рРНК.
Note. 16S rRNA genes were sequenced in all studies.

Таблица 3. Суммарная характеристика обследованных лиц, включённых в метаанализ**Table 3.** Cumulative characteristics of the study population included in the meta-analysis

Анализируемые признаки Analyzed attributes	Группа исследования Study groups			
	здоровые лица healthy patients	пациенты с ХП patients with CP	пациенты с ХП и АТ patients with CP and AT	пациенты с ХП и СД2 patients with CP and T2D
<i>n</i>	1529	2394	136	258
Возраст, лет Age, years	18–70	18–64	40–79	26–62
Пол, % Sex, %	мужчины male	20–80	19–73	5–80
	женщины female	20–80	27–81	20–95
Курение, % Smokers, %	0–50	17–21	24–56	17–52
Глубина пародонтальных карманов, мм Depth of periodontal pockets, mm	< 3	≥ 5	≥ 5	≥ 5
Индекс кровоточивости, % Bleeding index, %	< 10	≥ 30	≥ 30	≥ 30
Уровень гликозилированного гемоглобина, % Glycosylated hemoglobin level, %	< 6%	< 6	< 7%	> 6,5

ты составляли 78,3 и 21,7% идентифицированных таксонов соответственно. При этом 15 (60,9%) таксонов принадлежали бактериям, не культивируемым на питательных средах. Пародонтопатоген *A. actinomycetemcomitans* был обнаружен в 7 (20%) образцах, за которыми следовали виды из рода *Pseudomonas*. Таким образом, результаты свидетельствуют о роли микробиоты полости рта, в частности, *A. actinomycetemcomitans*, в развитии воспаления в процессе атерогенеза [45].

Важно отметить, что ни в одном случае не указывалось на наличие в АТ-бляшках представителей вида *F. alocis*, в связи с чем эти данные по микробиому АТ-бляшек не были включены в проводимый метаанализ.

Сравнительный анализ таксономического состава субгингивального микробиома в группах исследования

Для сравнительной оценки общих тенденций изменений со стороны микробиома в группах лю-

дей со здоровым пародонтом, при ХП без системной патологии, ХП в ассоциации с АТ или с СД2 прежде всего определялось соотношение бактерий, принадлежащих к разным типам: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Synergistes*, *Spirochaetes*.

Сравнительный статистический анализ результатов осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA), он был направлен на исследование значимости различия между средними величинами с учётом разброса (дисперсии) данных по каждому показателю. Количественным выражением такого разброса служил критерий Фишера (F) с указанием вероятности (*p*) его статистической значимости.

Как следует из представленных данных, статистически значимых различий по процентному содержанию отдельных типов бактерий в составе микробиома, кроме таксономической группы ТМ7, не установлено (табл. 4) в связи с высокой гетерогенностью данных. Этот вывод распространяется и

Таблица 4. Представительство бактерий каждого типа в субгингивальном микробиоме по группам исследования**Table 4.** Representation of bacteria of each type in the subgingival microbiome by study group

Тип бактерий Bacteria type	Представительство бактерий в микробиоме, % (медиана (минимум; максимум)) Bacterial representation in the microbiome, % (median (minimum; maximum))				One-way ANOVA	
	здоровые лица healthy patients	пациенты с ХП patients with CP	пациенты с ХП и АТ patients with CP and AT	пациенты с ХП и СД2 patients with CP and T2D	F	<i>p</i>
<i>Firmicutes</i>	29,0 (0,6; 43,3)	30,2 (1,1; 41,0)	45,6 (38,3; 52,8)	31,4 (24,5; 68,8)	2,162	0,126
<i>Proteobacteria</i>	30,2 (15,4; 57,9)	27,9 (15,5; 29,2)	18,6 (15,1; 22,2)	17,2 (6,5; 26,6)	0,958	0,438
<i>Bacteroides</i>	10,4 (0; 31,0)	11,7 (0,1; 35,0)	17,5 (5,7; 11,0)	18,8 (11,8; 28,5)	0,964	0,426
<i>Actinobacteria</i>	15,6 (3,6; 16,2)	7,3 (5,7; 11,0)	2,7 (1,5; 3,9)	15,4 (7,2; 16,9)	1,211	0,340
<i>Fusobacteria</i>	12,6 (2,0; 15,6)	16,4 (8,0; 18,7)	7,4 (5,1; 9,7)	9,8 (3,1; 17,0)	0,936	0,448
ТМ7	1,3 (0; 1,8)	4,2 (2,5; 6,5)	–	1 (0; 2,1)	7,879	0,013
<i>Spirochaetes</i>	0,9 (0; 2,7)	2,3 (0,1; 20,0)	6,1 (5,3; 7,0)	0,4 (0; 1,1)	0,799	0,522

на тип *Firmicutes*, к которому принадлежит основной объект нашего внимания — вид *F. alocis*.

Полученные результаты в сравнительном аспекте касались процентного соотношения отдельных бактерий различной родовой принадлежности в различных группах исследования (рис. 1).

Во всех образцах субгингивального микробиома, содержащих представителей рода *Filifactor* и вошедших в данное исследование, этому роду сопутствовали ещё 70 родов бактерий. В тех случаях, когда в источнике литературы имелись данные о видовом составе микробиома, в род *Filifactor* входил только один вид — *F. alocis*, причём в разных группах исследования содержание бактерий рода *Filifactor* было различным. Так, в группе здоровых людей доля этих бактерий (в %) среди представителей других видов с обозначением медианы (минимума; максимума) составляла только 0,66 (0,1; 5,8); в группе ХП без системной патологии — 3 (0,1; 13,0); при ассоциации ХП + АТ показатель также был низким — 0,12 (0,05; 0,27); а при ассоциации ХП + СД2 — существенно выше: 1,6 (1,0; 2,3).

Таким образом, бактерии рода *Filifactor* показывали относительно низкое содержание в составе субгингивального микробиома у здоровых людей и при ассоциации ХП + АТ. При ассоциации ХП + СД2 медиана доли этих бактерий в микробиоме пародонта была в 2,4 раза выше, чем у здоровых людей, а у пациентов с ХП без системной патологии — в 4,5 раза выше. Тем не менее разброс данных по каждой выборке не позволил установить статистически значимые различия при сравнении методом One-way ANOVA: в группах «здоровые лица — ХП» $F = 1,910$ при $p = 0,192$; в группах «здоровые лица — ХП + АТ» $F = 0,427$ при $p = 0,527$; в группах «здоровые лица — ХП + СД2» $F = 0,002$ при $p = 0,963$.

В составе субгингивального микробиома здоровых людей преобладали представители следующих родов: *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Moraxella*, *Veillonella*; у пациентов с ХП без системной патологии — *Fusobacterium*, *Fretibacterium*, *Lachnoaerobaculum*, *Prevotella*, *Streptococcus*; при ХП + АТ — *Streptococcus*, *Veillonella*, *Propionibacterium*; при ХП + СД2 — *Prevotella*, *Streptococcus*, *Leptotrix*, *Veillonella*, *Actinomyces*.

Все эти данные послужили основой для выполнения корреляционного анализа, который позволил определить возможные связи бактерий рода *Filifactor* с другими бактериями той же локализации.

Метаанализ корреляционных связей бактерий рода *Filifactor* с другими родами бактерий в составе субгингивального микробиома в группах исследования

Корреляционный анализ данных в виде парных корреляций проводили путём определения коэффициента корреляции Спирмена (r) и его стати-

стической значимости (p) между бактериями рода *Filifactor* (вид *F. alocis*) и остальными бактериями в составе субгингивального микробиома отдельно для каждой группы исследования.

Содержание бактерий рода *Filifactor*, представленного только одним видом *F. alocis*, в составе микробиома зубодесневой борозды людей со здоровым пародонтом было относительно небольшим и было корреляционно связано на статистически значимом уровне с бактериями 8 родов (рис. 2, а). С бактериями родов *Actinomyces*, *Brachybacterium*, *Mogibacterium*, которые, как и *Filifactor*, относятся к грамположительным микроорганизмам, корреляции были положительными, в то время как с остальными 5 родами (*Acinetobacter*, *Alloprevotella*, *Campylobacter*, *Microbacterium*, *Moraxella*) — отрицательными.

У больных ХП с неотмеченным сопутствующим системным эффектом отмечается явное количественное преобладание бактерий рода *Fusobacterium* (16,8%), отрицательно корреляционно связанных с бактериями рода *Filifactor* (рис. 2, б). Кроме того, значительно возрастает доля самого *F. alocis* в микробиоме и примерно в 2 раза увеличивается число корреляционных связей этого пародонтопатогена с другими бактериями, притом что примерно половина из них являются положительными, обеспечивающими синергизм колонизации биотопа. К числу последних принадлежат бактерии родов *Desulfobulbus*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Odoribacter*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*, среди которых в равной степени представлены как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы.

Содержание бактерий рода *Filifactor* при осложнении ХП таким системным заболеванием, как АТ, было минимальным (рис. 2, в). Тем не менее обращает на себя внимание обилие корреляционных пар, рост спектра вовлечённых в них микроорганизмов при явном преобладании положительных корреляций. В составе корреляционных пар появляются такие роды бактерий, как *Aggregatibacter*, *Atopobium*, *Cardiobacterium*, *Fretibacterium*, *Haemophilus*, *Halomonas*, *Kingella*, *Megasphaera*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Veillonella*, среди которых только 3 рода (*Atopobium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*) принадлежат к грамположительным микроорганизмам.

На рис. 2, г представлен круг корреляций *F. alocis*, численность которого была примерно в 10 раз выше, чем при сопутствующем АТ, с родами бактерий, входящими в субгингивальный микробиом при ХП, ассоциированном с СД2. При корреляционном анализе в этом аспекте число парных корреляций падало по сравнению с другими анализируемыми патологическими состояниями до 11 при примерно одинаковом соотноше-

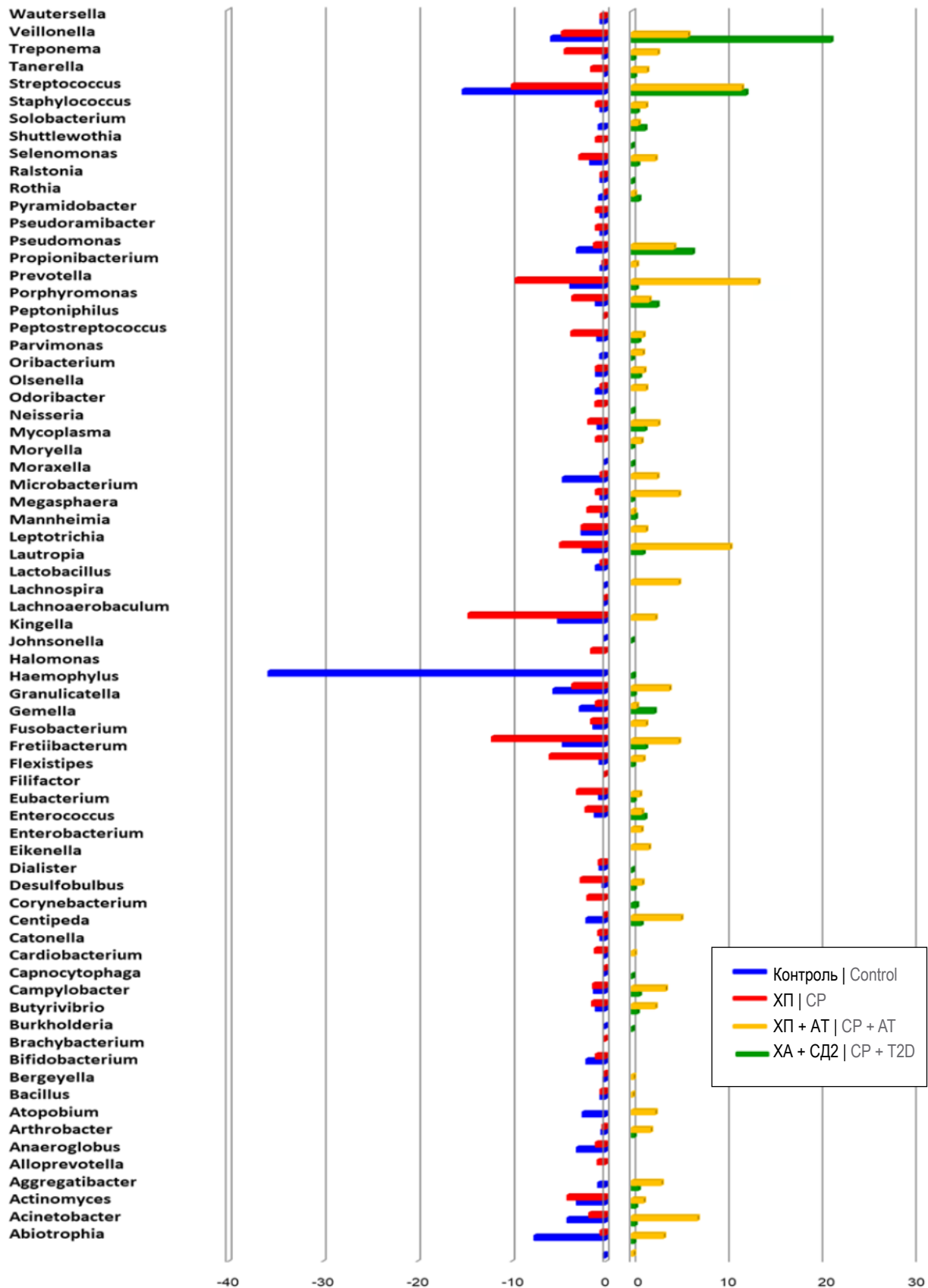


Рис. 1. Представительство наиболее часто встречающихся родов бактерий в субгингивальном микробиоме по группам исследования. Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 1. Representation of the most frequent bacterial genera in the subgingival microbiome by study group. For a color version of the figure, see the journal's website.

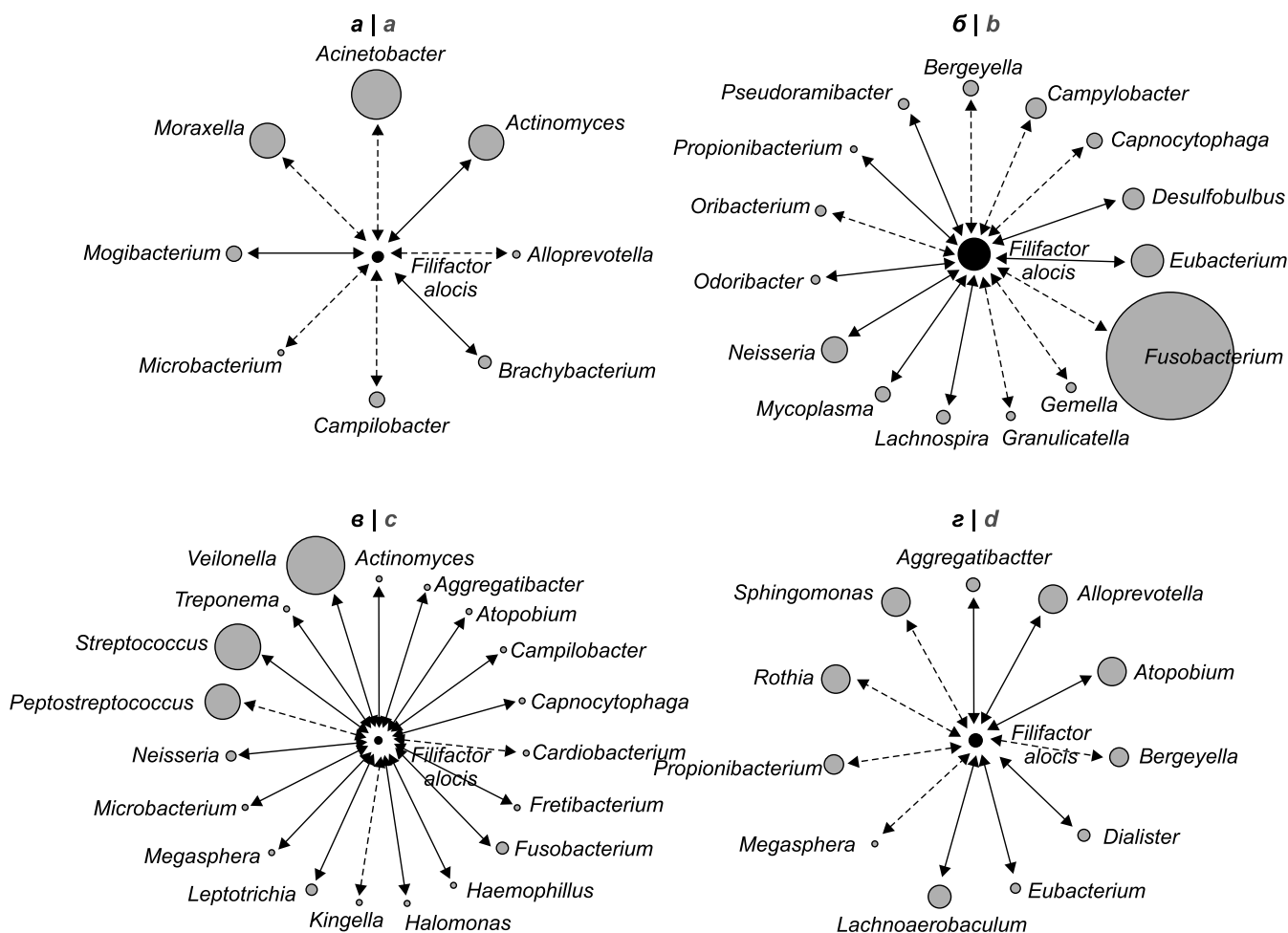


Рис. 2. Корреляционные связи *F. alocis* с другими бактериями субгингивального микробиома у здоровых людей (а), при ХП (б), ХП + АТ (в), ХП + СД2 (г). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-500-2>

Диаметр круга, обозначающего родовую принадлежность бактерии, примерно отражает количественное представительство данного рода бактерий среди остальных обнаруженных родов. Сплошные стрелки — положительная корреляция, пунктирные — отрицательная. На рисунках представлены только статистически значимые корреляции при $p < 0,05$.

Fig. 2. Correlations of *F. alocis* with other bacteria of the subgingival microbiome in healthy subjects (a), in CP (b), CP + AT (c), CP + T2D (d). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-500-2>

The diameter of the circle denoting the genus of the bacterium roughly reflects the quantitative representation of this genus of bacteria among the other detected genera. Solid arrows indicate positive correlation, dashed arrows indicate negative correlation. The presented figures show only statistically significant correlations at $p < 0.05$.

нии положительных и отрицательных корреляций. Среди положительных корреляций можно отметить участие грамотрицательных бактерий родов *Aggregatibacter*, *Alloprevotella*, *Dialister*, а среди грамположительных — *Atopobium*, *Eubacterium*, *Lachnoanaerobaculum*.

Обсуждение

Оценивая результаты корреляционного анализа, следует подчеркнуть несколько особенностей. Во всех группах содержание бактерий *F. alocis* было различным — от минимального при ассоциации ХП и АТ до максимального при ХП без системных эффектов. В составе корреляционных пар не было ни одного рода бактерий, который встречался бы во всех 4 группах. Представленные в нашей работе диаграммы свидетельствуют о существовании мно-

гочисленных корреляционных связей *F. alocis* с другими компонентами микробиома, что в сочетании с данными о наличии у него экзотоксина, как и у *A. actinomycetemcomitans* [12], позволяет поставить вопрос о его отнесении к пародонтопатогенным видам I порядка.

Один из зарубежных метаанализов, проведенный в рамках международного проекта Human Microbiome Project, показал, что над- и поддесневые зубные отложения (биоплёнка) представлены 14 таксонами микроорганизмов, которые являются самыми многочисленными как по частоте выявления, так и в количественном выражении в составе биоплёнки десны: *Actinomyces*, *Aggregatibacter*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Wolinella* [6].

Исходя из цели метаанализа, представленного в нашей статье, особого внимания заслуживали те бактерии, которые появлялись в составе корреляционных пар: либо только при ХП без системных эффектов; либо только при ассоциации ХП как с АТ, так и с СД2; либо только при АТ или только при СД2. Видовую принадлежность бактерий, связанных корреляционно с *F. alocis*, установить не удалось, поскольку только единичные из отобранных источников литературы содержали эти сведения, что оказалось недостаточным для выявления статистически значимых корреляций. Только в первую категорию корреляций (ХП без системных эффектов) с бактериями рода *Filifactor* входили представители 8 родов: *Desulfobulbus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Lachnospira*, *Mycoplasma*, *Odoribacter*, *Oribacterium*, *Pseudoramibacter*. Среди указанных родов не было родов бактерий, содержащих общепризнанных пародонтопатогенов. Вторая категория, связанная с проявлением системных эффектов болезней пародонта, включала только 3 рода: *Aggregatibacter*, *Atopobium*, *Megasphaera*. При этом представители рода *Aggregatibacter*, вошедшего в состав статистически значимых корреляционных пар, регистрировались в 58% образцов, а остальные 2 рода — в 42%. В тех источниках, что содержали сведения о видовом составе бактерий субгингивального микробиома, бактерии рода *Aggregatibacter* включали только один вид — *A. actinomycetemcomitans*, который относят к пародонтопатогенам I порядка.

Только при АТ регистрировались корреляционно значимые роды: *Cardiobacterium*, *Fretibacterium*, *Haemophilus*, *Halomonas*, *Kingella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Veillonella*. Только при СД2 в составе корреляционных пар отмечены 4 рода: *Dialister*, *Lachnoanaerobaculum*, *Rothia*, *Sphingomonas*. По видовому составу, где это было обозначено, принадлежности к пародонтопатогенам не было отмечено ни в одном случае.

Заключение

1. Проведён сравнительный метаанализ поддесневого микробиома в норме, при ХП и ХП, ассоциированным с коморбидной патологией, охватывающий 1529 здоровых лиц и 2394 пациентов с ХП, который позволил получить принципиально новые данные, подтверждающие различия групп сравнения по составу микробиома. По таксономической характеристике в составе поддесневого микробиома здоровых людей преобладали представители следующих родов: *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Moraxella*, *Veillonella*; у пациентов с ХП без системной патологии — *Fusobacterium*, *Fretibacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Prevotella*, *Streptococcus*; при ХП в ассоциации с АТ — *Streptococcus*, *Veillonella*, *Propionibacterium*;

при ХП в ассоциации с СД2 — *Prevotella*, *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Actinomyces*.

2. В результате метаанализа данных по родовой принадлежности бактерий, корреляционно связанных с бактериями рода *Filifactor*, которые в тех случаях, когда источники содержали сведения о видовом составе бактерий, принадлежали к виду *F. alocis*, установлено, что развитие ХП, условно не связанного с системной патологией, не позволяло определить значимых корреляций этих бактерий с другими пародонтопатогенами. Вместе с тем уточнено место *F. alocis* как пародонтопатогенного вида (возможно I порядка), т. к. он практически не встречается в составе нормальной микробиоты, что указывает на его относительно высокую вирулентность.

3. В группах пациентов, у которых ХП сопровождался наличием системной патологии — АТ или СД2, помимо ассоциантов-комменсалов, было подтверждено наличие статистически значимых корреляций с родом бактерий *Aggregatibacter*, содержащим пародонтопатогены I порядка, — *A. actinomycetemcomitans*. Представители родов *Porphyromonas* (*P. gingivalis*) и *Tannerella* (*T. forsythia*), по-видимому, имеют самостоятельное значение как пародонтопатогенные виды I порядка, ввиду высоких вирулентных свойств, независимо от симбионтов из других таксонов поддесневого микробиома.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Кузьмина Э.М., Янушевич О.О., Кузьмина И.Н. *Стоматологическая заболеваемость населения России. Эпидемиологическое стоматологическое исследование*. М.;2019. Kuz'mina E.M., Yanushevich O.O., Kuz'mina I.N. *Dental Morbidity of the Russian Population. Epidemiological Dental Examination*. Moscow;2019.
- Abusleme L., Dupuy A.K., Dutzan N., et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013;7(5): 1016–25. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
- Kassebaum N.J., Bernabé E., Dahiya M., et al. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression. *J. Dent. Res.* 2014;93(11):1045–53. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>
- Könönen E., Gursoy M., Gursoy U.K. Periodontitis: a multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *J. Clin. Med.* 2019;8(8):1135. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm8081135>
- Tonetti M.S., Jepsen S., Jin L., Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: a call for global action. *J. Clin. Periodontol.* 2017;44(5):456–62. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12732>
- Балмасова И.П., Царев В.Н., Янушевич О.О. и др. Микробиология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов. М.;2021. Balmasova I.P., Tsarev V.N., Yanushevich O.O., et al. *Microecology of Periodontal Disease. The Relationship of Local and Systemic Effects*. Moscow;2021. EDN: <https://elibrary.ru/myzmbu>
- Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B., et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *J. Biomed. Sci.* 2019;42(1):27–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>

8. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;(5):101–12. Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;(5):101–12. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-101-112> EDN: <https://elibrary.ru/ctbcar>
9. Nikolaeva E.N., Tsarev V.N., Tsareva T.V., et al. Interrelation of cardiovascular diseases with anaerobic bacteria of subgingival biofilm. *Contemp. Clin. Dent*. 2019;10(4):637–42. DOI: https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_84_19
10. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol*. 1998;25(2):134–44. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
11. Ahmed H.J., Svensson J.A., Cope L.D., et al. Prevalence of cdtABC genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J. Med. Microbiol*. 2001;50(10):860–4. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-10-860>
12. Ozuna H., Snider I., Belibasakis G.N., et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Filifactor alocis*: Two exotoxin-producing oral pathogens. *Front. Oral Health*. 2022;3:981343. DOI: <https://doi.org/10.3389/froh.2022.981343>
13. Ушаков Р.В., Царев В.Н. *Антимикробная терапия в стоматологии: принципы и алгоритмы*. М.;2019. Ushakov R.V., Tsarev V.N. *Antimicrobial Therapy in Dentistry: Principles and Algorithms*. Moscow;2019.
14. Rafiei M., Kiani F., Sayehmiri K., et al. Prevalence of anaerobic bacteria (*P. gingivalis*) as major microbial agent in the incidence periodontal diseases by meta-analysis. *J. Dent. (Shiraz)*. 2018;19(3):232–42.
15. Hiranmayi K.V., Sirisha K., Ramoji Rao M.V., Sudhakar P. Novel pathogens in periodontal microbiology. *J. Pharm. Bioallied Sci*. 2017;9(3):155–63. DOI: https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_288_16
16. Moffatt C.E., Whitmore S.E., Griffen A.L., et al. *Filifactor alocis* interactions with gingival epithelial cells. *J. Mol. Oral Microbiol*. 2011;26(6):365–73. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00624.x>
17. Wang Q., Wright C.J., Dingming H., et al. Oral community interactions of *Filifactor alocis* in vitro. *PLoS One*. 2013;8(10):e76271. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076271>
18. Aja E., Mishra A., Dou H., Fletcher H.M. Role of the *Filifactor alocis* hypothetical protein FA519 in oxidative stress resistance. *Microbiol. Spectr*. 2021;9(3):e0121221. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01212-21>
19. Царева Т.В., Янушевич О.О., Царев В.Н., Балмасова И.П. Бактерии рода *Filifactor* у больных пародонитом и сахарным диабетом по данным метагеномного анализа микробиома пародонта. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):485–94. Tsareva T.V., Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Balmasova I.P. Bacteria of genus *Filifactor* in patients with periodontitis and type 2 diabetes in accordance with metagenomic analysis of the periodontal microbiome. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(6):485–94. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-428> EDN: <https://elibrary.ru/yqoxxk>
20. Янушевич О.О., Царев В.Н., Балмасова И.П. и др. Первый опыт применения отечественного диагностического набора генетических праймеров для выявления нового пародонтопатогена *Filifactor alocis* и его ассоциации с *Porphyromonas gingivalis*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022;67(12):744–8. Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Balmasova I.P., et al. The first experience of using a domestic diagnostic set of genetic primers to identify a new periodontopathogen *Filifactor alocis* and its association with *Porphyromonas gingivalis*. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2022;67(12):744–8. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-744-748> EDN: <https://elibrary.ru/djlzfu>
21. Янушевич О.О., Царев В.Н., Николаева Е.Н. и др. Первый отечественный опыт выявления ассоциации анаэробных бактерий *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis* молекулярно-биологическими методами при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (сравнительное исследование). *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2022;77(6):437–46. Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., et al. The first domestic experience of detecting the association of anaerobic bacteria *Filifactor alocis* and *Porphyromonas gingivalis* by molecular biological methods in periodontal diseases and comorbid pathology (comparative research). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(6):437–46. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn2262> EDN: <https://elibrary.ru/pzajok>
22. Kumar P.S., Griffen A.L., Moeschberger M.L., et al. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J. Clin. Microbiol*. 2005;43(8):3944–55. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.3944-3955.2005>
23. Griffen A.L., Beall C.J., Campbell J.H., et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012;6(6):1176–85. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.191>
24. Liu B., Faller L.L., Klitgord N., et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS One*. 2012;7(6):e37919. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037919>
25. Costalonga M., Herzberg M.C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol. Lett*. 2014;162(2 Pt. A):22–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
26. Filho W.S.S., Casarin R.C.V., Junior E.L.N., et al. Microbial diversity similarities in periodontal pockets and atheromatous plaques of cardiovascular disease patients. *PLoS One*. 2014;9(10):e109761. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109761>
27. Lourenço T.G.B., Heller D., da Silva-Boghossian C.M., et al. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J. Clin. Periodontol*. 2014;41(11):1027–36. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>
28. Pérez-Chaparro P.J., Gonçalves C, Figueiredo L.C., et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis. *J. Dent. Res*. 2014;93(9):846–58. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034514542468>
29. Park O.J., Yi H., Jeon J.H., et al. Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions. *J. Dent. Res*. 2015;94(7):921–7. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034515583531>
30. Ziganshina E.E., Sharifullina D.M., Lozhkin A.P., et al. Bacterial communities associated with atherosclerotic plaques from Russian individuals with atherosclerosis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164836. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164836>
31. Demmer R.T., Breskin A., Rosenbaum M., et al. The subgingival microbiome, systemic inflammation and insulin resistance: The oral infections, glucose intolerance and insulin resistance study. *J. Clin. Periodontol*. 2017;44(3):255–65. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12664>
32. Ganesan S.M., Joshi V., Fellows M., et al. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *ISME J*. 2017;11(9):2075–89. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.73>
33. Long J., Cai Q., Steinwandel M., et al. Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk. *J Periodontol Res*. 2017;52(3):636–43. <https://doi.org/10.1111/jre.12432>

34. Graves D.T., Corrêa J.D., Silva T.A. The oral microbiota is modified by systemic diseases. *J. Dent. Res.* 2019;98(2): 148–56. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034518805739>
35. Rodríguez-Hernández A.P., de Lourdes Márquez-Corona M., Pontigo-Loyola A.P., et al. Subgingival microbiota of Mexicans with type 2 diabetes with different periodontal and metabolic conditions. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019;16(17):3184. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16173184>
36. Saeb A.T.M., Al-Rubeaana K.A., Aldosaryb K., et al. Relative reduction of biological and phylogenetic diversity of the oral microbiota of diabetes and pre-diabetes patients. *Microb. Pathog.* 2019;128:215–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.009>
37. Matsha T.E., Prince Y., Davids S., et al. Oral microbiome signatures in diabetes mellitus and periodontal disease. *J. Dent. Res.* 2020;99(6):658–65. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034520913818>
38. Bouzid F., Gtifi I., Alfadhli S., et al. A potential oral microbiome signature associated with coronary artery disease in Tunisia. *Biosci. Rep.* 2022;42(7):BSR20220583. DOI: <https://doi.org/10.1042/BSR20220583>
39. Curia M.C., Pignatelli P., D'Antonio D.L., et al. Oral *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* abundance in subjects in primary and secondary cardiovascular prevention, with or without heterozygous familial hypercholesterolemia. *Biomedicines.* 2022;10(9):2144. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092144>
40. Rao A., Lokesh J., D'Souza C., et al. Metagenomic analysis to uncover the subgingival and atherosclerotic plaque microbiota in patients with coronary artery disease. *Indian J. Microbiol.* 2023;63(3):281–90. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01082-9>
41. Kato-Kogoe N., Sakaguchi S., Kamiya K., et al. Characterization of salivary microbiota in patients with atherosclerotic cardiovascular disease: a case-control study. *J. Atheroscler. Thromb.* 2022;29(3):403–21. DOI: <https://doi.org/10.5551/jat.60608>
42. Solbiati J., Frias-Lopez J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. *J. Dent. Res.* 2018;97(5):492–500. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034518761644>
43. Figuero E., Sánchez-Beltrán M., Cuesta-Frechoso S., et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaques by nested polymerase chain reaction. *J. Periodontol.* 2011;82(10): 1469–77. DOI: <https://doi.org/10.1902/jop.2011.100719>
44. Ohki T., Itabashi Y., Kohno T., et al. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am. Heart J.* 2012;163(2):164–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2011.10.012>
45. Calandrini C.A., Ribeiro A.C., Gonnelli A.C., et al. Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Dis.* 2014; 20(3):128–34. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.12205>

Информация об авторах

Царева Татьяна Викторовна — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Российского университета медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

Балмасова Ирина Петровна — д.м.н., профессор, зав. лаб. патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний Научно-исследовательского медицинского стоматологического института Российского университета медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

Царев Виктор Николаевич — д.м.н., профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии Российского университета медицины, Москва, Россия, nikola777@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Участие авторов: Царева Т.В. — сбор биоматериала от пациентов, проведение молекулярно-генетических исследований, анализ базы полученных данных генетических исследований, интерпретация литературных данных; Балмасова И.П. — проведение молекулярно-генетических исследований биоматериала, биоинформационный и статистический анализ, написание текста статьи; Царев В.Н. — дизайн исследования, проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований биоматериала, написание и редактирование текста статьи. 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 10.02.2024;
принята к публикации 23.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Tatyana V. Tsareva — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of microbiology, virology, immunology, Russian University of Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

Irina P. Balmasova — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of pathogenesis and methods of treatment of infectious diseases, Scientific Research Medical Dental Institute, Russian University of Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

Viktor N. Tsarev — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of microbiology, virology, immunology, Russian University of Medicine, Moscow, Russia, nikola777@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Author contribution: Tsareva T.V. — collecting biomaterial from patients, conducting molecular genetic studies, analyzing the database of obtained data of genetic studies, interpretation of literature data; Balmasova I.P. — conducting molecular genetic studies of biomaterial, bioinformatical and statistical analysis, writing the text of the article; Tsarev V.N. — study design, conducting microbiological and molecular genetic studies of biomaterial, writing and editing the text 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 10.02.2024;
accepted for publication 23.03.2024;
published 29.04.2024

НЕКРОЛОГИ

Памяти Алексея Кимовича Носкова (14.04.1971–31.03.2024)



31 марта 2024 г. на 53-м году жизни скоропостижно ушёл из жизни директор Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, кандидат медицинских наук Алексей Кимович Носков.

Алексей Кимович продолжил династию врачей. Свою жизнь он посвятил обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения нашей страны в мирное время и в вооружённых конфликтах; участвовал в организации спасательных мероприятий при ликвидации последствий землетрясения, паводков, опасных метеорологических явлений; в период пандемии COVID-19.

В послужном списке Алексея Кимовича — воинская служба в должности начальника медицинской службы воинской части; работа на Читинской противочумной станции в должностях врача-инфекциониста, заведующего бактериологической лабораторией, заместителя начальника станции по эпидемиологической работе; в Управлении Роспотребнадзора по Забайкальскому краю в должности начальника отдела надзора на транспорте и санитарной охраны территории; в Иркутском ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательском противочумном институте Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора в должности заведующего отделом санитарной охраны территории и мониторинга чрезвычайных ситуаций. В 2010 г. он защитил кандидатскую диссертацию на тему «Эпи-

демиологические закономерности лептоспирозов в Забайкальском крае» по специальности 14.02.02 — эпидемиология.

С октября 2019 г. А.К. Носков занимал должность директора Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. Под его руководством в институте проводились актуальные исследования по совершенствованию эпидемиологического надзора за холерой и другими особо опасными и природно-очаговыми инфекционными болезнями, их лабораторная диагностика и профилактика. Алексей Кимович являлся руководителем Референс-центра по мониторингу за холерой, председателем Ростовского регионального отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Большое внимание А.К. Носков уделял взаимодействию с другими учреждениями Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения.

Алексей Кимович — автор более 240 научных работ, 10 нормативно-методических документов федерального уровня, 8 свидетельств о регистрации базы данных.

Заслуги Алексея Кимовича отмечены в 2006 г. Почетной грамотой Министерства здравоохранения и социального развития РФ, в 2013 г. — памятной медалью «90 лет Госсанэпидслужбе России» и благодарностью губернатора Хабаровского края, в 2021 г. — нагрудным знаком «Почётный работник Роспотребнадзора», в 2022 г. — орденом Пирогова и медалью Фёдора Гааза. А.К. Носков — лауреат премии лучшим врачам России «Призвание» (2014, 2022 гг.) и победитель Всероссийского конкурса врачей в номинации «За создание нового метода диагностики» (2022 г.).

Мы помним Алексея Кимовича как целеустремлённого, высококвалифицированного специалиста в области эпидемиологии, который постоянно совершенствовал свои знания и навыки. Его отличали подлинный профессионализм, самоотверженность и преданность своему делу. Глубокие знания, большой практический опыт и весомый вклад в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны принесли глубокое уважение и признание коллег. Безвременная смерть А.К. Носкова вызвала искреннюю скорбь у сотрудников Ростовского-на-Дону

противочумного института. Алексей Кимович навсегда останется в наших сердцах талантливым учёным, мудрым руководителем, отзывчивым и жизнелюбивым человеком.

Коллектив Ростовского-на-Дону противочумного института и редакция журнала выражают глубокие соболезнования родным и близким Алексея Кимовича.

ЮБИЛЕИ



Выдающийся деятель отечественного здравоохранения и медицинской науки XX века Виктор Михайлович Жданов (к 110-летию со дня рождения)

«Кто не помнит истории,
тот не имеет будущего»
Вольтер

13 февраля мы отдаём дань памяти и глубочайшего уважения великому гражданину XX века академику АМН СССР Виктору Михайловичу Жданову — выдающемуся деятелю отечественного здравоохранения, известному во всём мире учёному, вирусологу, эпидемиологу, талантливому организатору санитарно-эпидемиологической службы СССР, медицинской и вирусологической науки, директору Института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР на протяжении 26 лет.

37 лет мы живём без В.М. Жданова. Время позволяет глубже осмыслить прошедшие события, оценить по достоинству заслуги и поступки людей, оставляет в памяти наиболее яркие впечатления и воспоминания. Чем ярче, талантливей, демократичней личность, тем полнее удастся оценить масштабы её вклада в мировую науку. Вспоминая, мы молодеем вместе с ним, пытаемся понять «феномен В.М. Жданова»

С 1950 по 1960 г. В.М. Жданов (ему 36–46 лет) возглавлял санитарно-эпидемиологическую службу СССР сначала как начальник Главного противоэпидемического Управления СССР, а затем (1955–1960 гг.) как заместитель Министра здравоохранения СССР и Главный государственный санитарный инспектор страны. В.М. Жданов внёс существенный вклад в организацию санитарно-эпидемиологической службы в нашей стране. В эти годы по его инициативе в структуре санитарно-противоэпидемических станций страны были созданы вирусологические подразделения, что значительно повлияло на оперативное осуществление мер специфической и неспецифической профилактики инфекционных заболеваний человека в масштабах всей страны.



Виктор Михайлович Жданов,
13.02.1914–14.07.1987

В.М. Жданов внёс весомый вклад в совершенствование и развитие структуры санитарно-профилактической и карантинной службы в погранвойсках Сибири (Новокузнецк, Чита), а затем в Туркестанском округе (Ашхабад, 1936–1945 гг.). Сегодня его по праву считают одним из основоположников государственной санитарно-эпидемиологической службы в погранвойсках. Заслуги В.М. Жданова были отмечены орденом Красной Звезды (1945) и Знаком «Почетный пограничник СССР» (1984).

В.М. Жданов научно обосновал возможность ликвидации натуральной оспы во всём мире. По поручению Правительства СССР программа эрадикации оспы была представлена руководителем советской делегации

В.М. Ждановым на XI Всемирной Ассамблее здравоохранения (1958 г.). После сложной дискуссии Программа была принята как предложение СССР. Наша страна безвозмездно выделила 25 млн доз противосспенной вакцины. Осуществление глобальной программы позволило спасти от оспы около 200 млн человек во всём мире.

В 1958 г. Жданов был избран членом Исполкома ВОЗ и неоднократно выезжал в инспекционные поездки в страны Азии и Африки с высокими показателями эндемической заболеваемости натуральной оспой. Ликвидация натуральной оспы во всем мире сегодня расценивается как выдающееся достижение человечества XX века, сравнимое с выходом человека в космос и исследованиями в области ядерной энергетики. За выдающиеся заслуги в деле ликвидации оспы во всём мире он был награждён орденом Бифуркационной Иглы и Почётной грамотой Всемирной организации здравоохранения

(1987), а в 2020 г. удостоен именной Премии «Life for Future Award» («Жизнь для будущего»).

В.М. Жданов был избран членом-корреспондентом АМН СССР в 1950 г. (ему 36 лет), а в 1961 г. — действительным членом АМН СССР (47 лет). Он был самым молодым членом АМН СССР.

В 1956 г. В.М. Жданов создал журнал «Вопросы вирусологии» и был его главным научным редактором на протяжении 31 года. Журнал вскоре стал рупором научных достижений и даже переводился на английский язык.

В 1956–1987 гг. В.М. Жданов являлся председателем Всесоюзного общества эпидемиологов, микробиологов, паразитологов и инфекционистов.

В 1960–1963 гг. В.М. Жданов был Главным учёным секретарем АМН СССР; с 1961 по 1987 г. — директором Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

«Звездными часами» назвал Стефан Цвейг переломные моменты в истории государств и великих личностей. Определяющую роль академика В.М. Жданова в развитии отечественной молекулярной вирусологии и создании современного Института вирусологии можно сравнить со звездными часами. Один иностранный ученый так охарактеризовал наш Институт: «Здесь очень высокая концентрация интеллекта на единицу площади».

«Жданов был сильной фигурой. Будучи директором Института вирусологии им. Ивановского с 1961 г., он одним из первых советских учёных занялся проблемами молекулярной биологии вирусов и одним из первых обратил внимание общественности на проблему СПИД. Жданов ушёл из жизни, полный научных планов», — так оценила мировая научная общественность вклад Жданова в развитие исследований в области вирусологии.

Проблема классификации и эволюции вирусов, к которой В.М. Жданов неоднократно обращался в течение жизни, признаётся как одна из его важнейших заслуг. С 1956 г. Виктор Михайлович (после публикации его монографии «Заразные болезни человека. Систематика и эволюция», 1953 г.) — пожизненный член Международного комитета по классификации и таксономии вирусов.

Талант В.М. Жданова — крупного теоретика биологии и медицины — прекрасно проявился в

его 32 научных книгах и монографиях, в том числе 7 изданных за рубежом. Всего им написаны более 1500 научных работ. В.М. Жданов создал в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского школу генно-инженерных исследований и внёс значительный вклад в изучение молекулярных основ репродукции вирусов, в исследования новых и возвращающихся инфекций, механизмов острых и хронических вирусных инфекций, вирусных гепатитов, гриппа, онкорнавирусов, герпетических инфекций, ВИЧ-инфекции и других социально значимых заболеваний человека. Под его руководством подготовлены более 78 докторских и кандидатских диссертаций.

Хорошо понимая роль фундаментальных исследований в разработке рациональных подходов к профилактике и лечению ВИЧ-инфекции, В.М. Жданов всемерно развивал и поддерживал теоретические направления в изучении ВИЧ, создал в Институте вирусологии Центр ВОЗ по изучению ВИЧ/СПИД и значительно расширил и укрепил международные научные связи с учёными Франции, Германии, Швеции и США.

В.М. Жданов — Лауреат премии Совета Министров СССР, премии Президиума АМН СССР им. Д.И. Ивановского и премии им. В.Д. Тимакова. В.М. Жданов — автор трёх научных открытий, утверждённых Государственным комитетом по делам открытий и изобретений СССР.

Правительство СССР высоко оценило заслуги В.М. Жданова в области фундаментальных и прикладных исследований, наградив его орденом В.И. Ленина (1984), двумя орденами Октябрьской Революции (1971, 1976), двумя орденами Трудового Красного Знамени (1961, 1966), орденом Красной Звезды (1945) и многими медалями.

В.М. Жданов был личностью чрезвычайно яркой, многогранной, богато одарённой природой, обладал выдающимся даром научного предвидения и огромной работоспособностью, ясным и чётким умом и феноменальной памятью, блестящими организаторскими способностями, неукротимой волей и необычайной жадностью жизни, оставаясь при этом скромным человеком. При анализе научного наследия В.М. Жданова начинаешь понимать, что сделанного им хватило бы на несколько жизней обычного человека.

*Л.В. Урываев,
д.м.н., проф., член-корреспондент РАН*