

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](http://www.crie.ru)

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

**ИЗДАТЕЛЬ:**  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора

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

*Начальник редакционно-  
издательского отдела:*  
Осокина Ольга Владимировна

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

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

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

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

Подписано в печать 29.04.2024.  
Формат 60×90<sup>1/8</sup>. Тираж 158 экз.  
Усл.-печ. л. 17,5.

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

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

## Заместители главного редактора

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

## Ответственные секретари

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

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

### Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

### Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16+

**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](http://www.crie.ru)

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

#### PUBLISHER:

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

#### EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on April 29, 2024.

Print format 60×90<sup>1/8</sup>.

Circulation 158 copies.

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

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

## EDITOR-IN-CHIEF

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

## Deputy Editors

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

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

## Executive Secretaries

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

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

## EDITORIAL BOARD

### Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Foreign members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## EDITORIAL COUNCIL

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

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

**Elena R. Meskina**, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Pediatric Infections, Department of Therapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

**Alexandra A. Nikonova**, Cand. Sci. (Biology), Head, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

## СОДЕРЖАНИЕ

### 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 тиадиазинонов 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<sup>-/-</sup>* ..... 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*<sup>-/-</sup> ..... 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 110<sup>th</sup> anniversary of his birth) ..... 295

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

## TOPICAL ISSUES IN SCIENCE

Review

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



### Genomic surveillance strategy

Vasily G. Akimkin<sup>1</sup>, Tatyana A. Semenenko<sup>2</sup>, Kamil F. Khafizov<sup>1</sup>, Svetlana V. Ugleva<sup>1✉</sup>,  
Dmitry V. Dubodelov<sup>1</sup>, Elena N. Kolosovskaya<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>I.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. *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>



Обзор

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

## Стратегия геномного эпидемиологического надзора

Акимкин В.Г.<sup>1</sup>, Семенов Т.А.<sup>2</sup>, Хафизов К.Ф.<sup>1</sup>, Углева С.В.<sup>1</sup>,  
Дубоделов Д.В.<sup>1</sup>, Колосовская Е.Н.<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Северо-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. *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>

## Introduction

The growing threat of epidemic and epizootic outbreaks of new and re-emerging infections, most of which are characterized by sudden onset, high mortality, lack of specific methods of diagnosis and treatment, require the development of new approaches to the organization of epidemiological surveillance. In the context of public health, systemic control and management of the epidemic process of infectious and parasitic diseases are closely related to the problem of biological safety, which is extremely relevant for all countries due to the expanding range of real and potential threats caused by the impact of dangerous biological agents [1–3].

### The concept of epidemiological surveillance

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 allowed us to formulate a number of concepts and provisions on the nature of the epidemic process: the theory of the mechanism of transmission of infectious pathogens by L.V. Gromashevsky [4] and the theory of natural foci of infectious diseases by E.N. Pavlovsky [5]. However, based on these theories, the leading scientists of the country developed the main provisions of epidemiologic surveillance, which had certain differences in interpretation. In the socio-ecological concept of the epidemic process formulated by academician B.L. Cherkassky, epidemiological surveillance was defined as a system of dynamic and comprehensive monitoring for the epidemic process of a particular disease in a certain territory in order to rationalize and improve the effectiveness of preventive and anti-epidemic measures [6]. According to the definition of academician V.I. Pokrovsky, epidemiologic surveillance is the informational support of the infectious disease prevention system, guaranteeing comprehensive tracking of the epidemic process and its determinants (screening) and clearly responding to all possible changes in its development (monitoring) [7].

According to the theory of academician V.D. Belyakov, the basis for the development of the epidemic process are phase changes in the heterogeneity of biological properties of interacting populations of the pathogen and humans, based on feedbacks in the process of self-regulation, with social and natural factors being an important part of it [8]. According to this theory, epidemiologic surveillance is considered as a management system that involves dynamic assessment of trends in the development of the epidemic process in space and time, providing timely intervention in its course in order to reduce the incidence of disease in the general population and eliminate individual infections [9]. In this definition, the goals of epidemiologic surveillance coincide with the goals of the anti-epidemic system as a whole. It is the concept of the self-regu-

lation mechanism of parasitic systems that formed the fundamental basis for the practice of epidemiological surveillance developed in the modern period, which is defined as continuous assessment of the state and trends in the development of the epidemic process for the timely adoption of management decisions that ensure the implementation of measures adequate to the situation.

There are no significant differences in the understanding of the essence of epidemiological surveillance between Russian and foreign experts, but the emphasis is different. Thus, according to the definition of the World Health Organization (WHO), epidemiological surveillance is a systematic continuous collection, comparison, analysis of data and timely dissemination of information among interested parties to make certain decisions [10]. In the domestic health care system, the fact that the object of epidemiological surveillance is the epidemic process, which is a unity of biological, natural and social factors, and the surveillance itself began to be considered as a tool for its cognition, was generally recognized.

### Epidemiological surveillance system

The system of epidemiologic surveillance includes three interrelated subsystems: informational, diagnostic and managerial.

The information subsystem is the basic section of epidemiologic surveillance, which takes into account and records data on the status and trends of the epidemic process, causes (biological factor) and conditions (social and natural factors) that support it in a particular territory. Depending on the epidemiological features of the infectious disease, the level of theoretical knowledge and practical capabilities, epidemiological and socio-ecological monitoring are realized.

Diagnostic subsystem provides pre-epidemic diagnostics, including timely detection of preconditions and precursors of epidemic disadvantage, as well as forecasting of further development of the epidemic situation based on the assessment of all information flows.

The management subsystem is focused on the inclusion of information, diagnostic and analytical data in epidemiologic surveillance, taking into account modern achievements of science and practice. Managerial decisions imply drawing up problem-thematic and program-targeted plans, control over their implementation and making adjustments to the tactics of the conducted activities taking into account changing risk factors [11].

### Russian platform for aggregation of information on virus genomes

The pandemic of a new coronavirus infection has made adjustments in all spheres of society, including the activities of the health care system. The XII Congress of the All-Russian Public Organization under the name of "All-Russian Scientific and Practical Society

of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists" outlined the main milestones of further development of the sanitary and epidemiological service of the country taking into account the transformation of the general paradigm of epidemiological surveillance and control. Changes in the socio-economic and epidemiological situation in Russia, increasing pressure of adverse environmental factors on humans, urbanization processes, development of new technologies in medicine, food industry and agriculture are reflected in the state of sanitary and epidemiological well-being of the population. Obviously, these trends require fundamentally new approaches to the organization and conduct of epidemiological surveillance of infectious diseases, development of regulatory and legal support, implementation of scientific solutions in practice [12].

The COVID-19 pandemic has vividly demonstrated the devastating consequences of mass infectious diseases that kill millions of people and undermine the global economy. The catastrophic expansion of the incidence of a new coronavirus infection has not only exposed the public health problems of most countries, but has also been an impetus for scientific progress in many fields of medical and biological sciences. The global spread of the new infection caused by SARS-CoV-2 has facilitated the development of innovative tools and technologies in various fields and accelerated the integration of genomic research into public health practice. There is an urgent need to develop new approaches to the organization of epidemiological analysis and forecasting of COVID-19 epidemic development using innovative platform solutions and digital technologies.

The organizational mission to create a system of molecular genetic monitoring during the pandemic COVID-19 belongs to A.Yu. Popova, the head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. In accordance with the set tasks and because of the vast experience of anti-epidemic work in Russia, a strategy of proactive response to the spread of a new coronavirus infection was implemented, which made it possible to prevent an excessive burden on the health care system, save millions of lives and prevent large-scale negative consequences for all spheres of life [13, 14].

In accordance with the Resolution of the Government of the Russian Federation dated 23.03. 2021 No. 448 "On Approval of the Temporary Procedure for Provision of Genome Decoding Data of the New Coronavirus Infection Pathogen (COVID-19)" to ensure rapid assessment of the dynamics of the spread of known and new genetic variants of SARS-CoV-2 circulating on the territory of the country, Virus Genome Aggregator of Russia (VGARus), which contains information on nucleotide sequences of SARS-CoV-2 viruses and their mutations circulating in the regions of Russia, was developed and implemented, and can be used for storage, systematization and sampling of data

for mutation detection and determination of virus genetic variants. VGARus was developed and consolidated by the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor. The software integrated into the VGARus platform allows analyzing sequencing results, determining the probable virus strain, generating standardized reports, and downloading samples for further sequencing [15]. VGARus makes it possible to continuously monitor the mutational variability of SARS-CoV-2, providing essential data for the detection of new genetic variants and tracking their prevalence in Russia. The algorithm of work with VGARus data allows to carry out operative and retrospective analysis of distribution of genetic variants of SARS-CoV-2 taking into account the latest information on genetic diversity of COVID-19 pathogen.

The main purpose of VGARus is to centralize the collection and analysis of the dynamics and structure of identified SARS-CoV-2 variants in Russia [16]. Currently, all Russian scientific institutions involved in coronavirus genome sequencing and registered as users on the portal have the opportunity to upload the studied genomic sequences to VGARus. The obtained registration certificates allow its participants to use information from the national database. The platform is accessed through the portal [genome.crie.ru](http://genome.crie.ru).

Thus, a scientific consortium was, in fact, created, which included institutions of Rospotrebnadzor, the Ministry of Health of the Russian Federation and a number of other agencies. Currently, more than 150 organizations are integrated into the VGARus system; a significant part of them perform mass sequencing of SARS-CoV-2 genomes and download sequences. Preliminary quality assessment of these samples is performed, which typically includes analysis using polymerase chain reaction to determine viral load and assess the suitability of the sample for next-generation whole-genome sequencing. Algorithms running in the database automatically perform mutation analysis and identification of the SARS-CoV-2 variant in each sample. After loading the nucleotide sequence of the virus, the system automatically starts the process of sequencing validation, analyzing the belonging to one or another genetic variant. The downloaded genomic information is processed using Pangolin and V-TRACE programs (developed by specialists of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor) in automated mode with subsequent bioinformatic analysis.

Each sample in the system contains not only the nucleotide sequence and technical data, but also information on the place and time of collection of biological material, as well as data on the examined person: sex, region, age, vaccination status, estimated number of contacts, comorbidities, recent foreign travel, etc. These data, given their epidemiologic significance, will allow them to be used for operational and retrospective analysis. When samples are registered in the database,

they will automatically receive an internal registration number, after which the SARS-CoV-2 genome sequence can be added to the sample information field. Technical information also includes data on the organizations involved in the collection, laboratory sample preparation, the date the sample was sent and received, the date the information was entered, and the date the current record was generated in the system [17–20].

### Molecular genetic monitoring during the COVID-19 pandemic

The national VGARus database, which contains a large set of SARS-CoV-2 sequences, is an invaluable resource for tracking and deciphering the evolution of the COVID-19 pandemic (Fig. 1).

During the first year of SARS-CoV-2 presence in the human population, no nucleotide substitutions in its genome that could significantly alter the pathogen's properties were detected. However, since preservation of the pathogen as a biological species is impossible without evolutionary development, the heterogeneity of the coronavirus population began to increase due to circulation of different variants with subsequent selection and formation of the epidemic variant of the pathogen. Dynamic monitoring of mutational variability of circulating coronaviruses started in Russia in December 2020. During this period, a genetic variant initially known as British was discovered, which was later renamed Alpha (B.1.1.7) in accordance with the WHO decision to abandon the use of country names to designate strains. Among the mutations found in the S-protein gene, the most significant were *N501Y*,

*P681H*, and  $\Delta 69-70$ , which affect the transmissibility of the virus and its ability to infect cells and evade the immune response. The discovery of the Alpha variant in Russia coincided with an increase in the number of cases in late 2020 and early 2021. Later, the Beta variant (B.1.351), first detected in the Republic of South Africa, and Gamma (P.1), identified in Brazil, were identified, but they were not widespread in Russia, accounting for only a small percentage of the total number of new cases. The Alpha variant spread across Russia in winter 2021, and in summer 2021, a new variant, Delta (B.1.617.2), emerged, which was accompanied by a significant increase in the number of cases and hospitalizations, a severe course of coronavirus infection and high mortality rates. The Delta genetic variant prevailed in Russia from May to December 2021, with its share among the identified variants approaching 100%. The dominant variant in all months of observation since the start of registration of genetic variant Delta was the variant, which was named AY.122 by the Pangolin classifier from 26.11.2021 (83.3%). In total, more than 400 sublineages of the Delta genetic variant were isolated in Russia.

The process of change of biological properties of SARS-CoV-2 virus with the subsequent change of prevailing genetic variants is associated with the evolution of the virus and the formation of its epidemic variant with a natural change in the immunological structure of the human population in the chain of circulation of the pathogen. As a result of changes in the population of SARS-CoV-2 virus during circulation of the Delta genetic variant (increased virulence, increased abun-

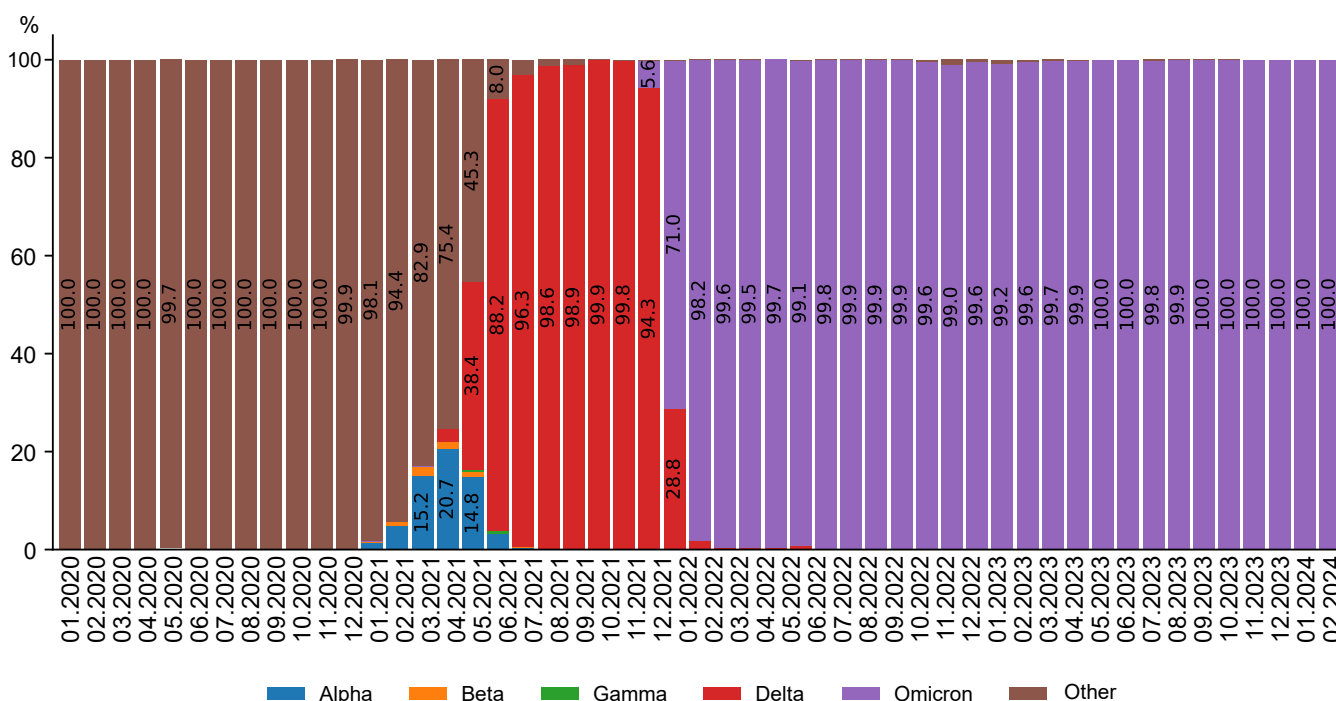


Fig. 1. Dynamics of SARS-CoV-2 genetic variants in Russia in 2020–2024.

dance), a new rise in morbidity among the population was observed. Going by the theory of self-regulation of parasitic systems, the process went from the phase of reservation to the phase of epidemic transformation and then epidemic spread. Changes in the genetic properties of the virus led to changes in its pathogenicity and, as a result, influenced the severity of the clinical course of the disease and the characteristics (indicators) of the manifestations of the epidemic process.

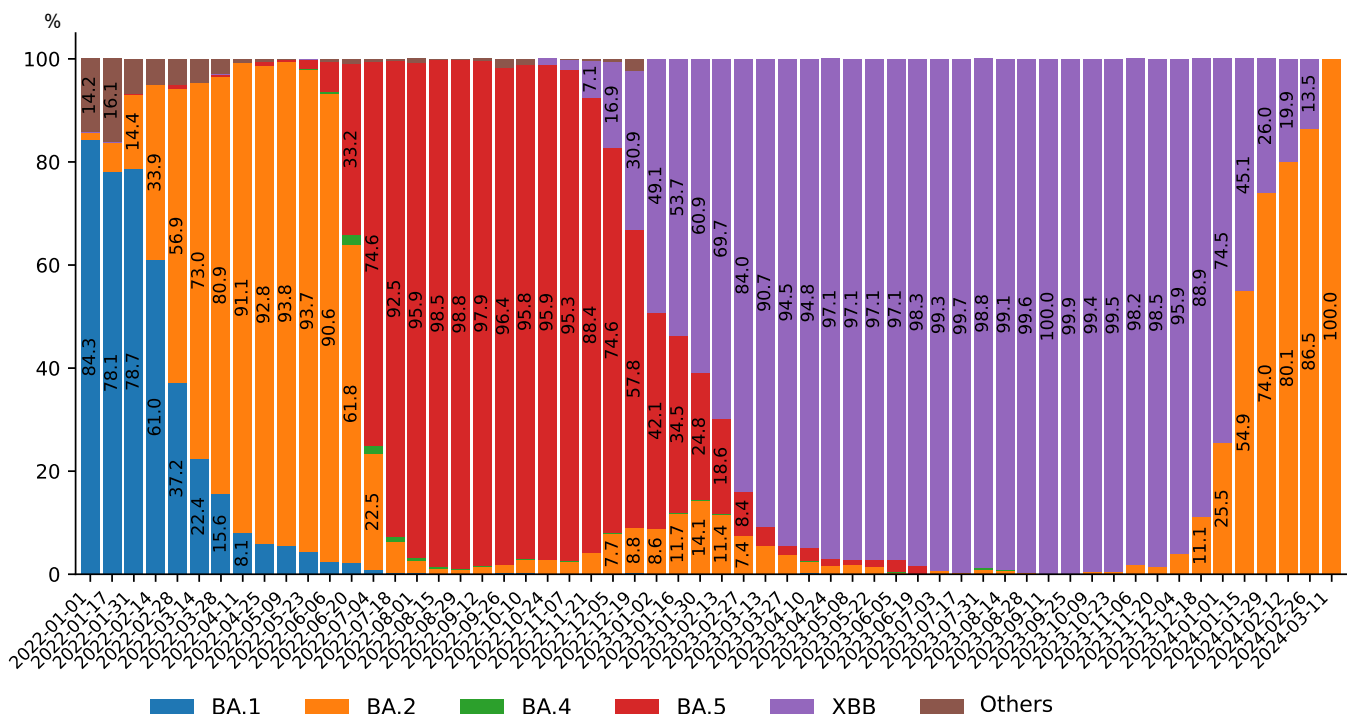
As a result of the interaction between the pathogen and human populations, taking into account their heterogeneity, a new variant of SARS-CoV-2 coronavirus, first identified in Botswana and South Africa, was identified in late 2021 and named Omicron (B.1.1.529 according to the PANGO classification) by WHO. The Omicron variant started to spread rapidly from December 2021 and is now completely dominant in Russia (100% of samples tested). Analysis of VGARus data revealed dissociation of the Omicron genetic lineage in Russia with the highest frequency of circulation of subvariants BA.1 (54.5%), BA.1.1.1 (21.6%) and BA.2 (23.8%).

Spring 2022 was a period of epidemiological well-being characterized by a low incidence of COVID-19. However, the emergence of Omicron subvariants BA.4 and especially BA.5 led to an increase in incidence that lasted until the end of October 2022. In late 2022 and early 2023, highly transmissible variants such as BQ.1\* (subvariant BA.5) emerged, indicating the dynamic and complex nature of SARS-CoV-2 evolution. The early months of 2023 saw a resurgence of new forms of old strains, including Omicron BA.2,

which returned as recombinant forms of XBB\*, being prevalent for most of 2023. Within the XBB lineage, its own prevalent forms emerged, such as XBB.1.5 (Kraken), XBB.1.16 (Arcturus), and XBB.1.9.2.1 (EG.5, Eris). The emergence of the latter coincided with the beginning of the increase in the incidence of the disease in the country in September 2023.

At the end of August 2022, a new SARS-CoV-2 variant, BA.2.86 (Pirola), which had many additional mutations compared to previous Omicron variants, was first detected in Denmark and Israel. However, it was not the cause of the increase in incidence in many countries, because the growth itself began earlier than the active spread of this genetic variant. The first cases of BA.2.86 infection were first detected in Russia in early November 2023, and further spread of BA.2.86 could slightly prolong the stage of the rise, including in January-February 2024, when the BA.2.86 JN.1 subvariant began to spread actively, becoming prevalent both in Russia and practically in all other countries. In total, more than 600 different Omicron sublineages have been registered in Russia, although this number may vary depending on the definition of the sublineage (**Fig. 2**).

SARS-CoV-2 has evolved and genomic changes have led to the emergence of such characteristics as more intense transmission, changes in clinical symptoms, evasion of the immune response, and drug resistance. The phase self-reorganization of the pathogen population during the emergence of the Omicron genetic variant led to a decrease in its virulence, which was accompanied by a decrease in the severity of diseases, the number of hospitalized and deceased patients,



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

which may indicate a phase of reserve transformation in accordance with the theory of self-regulation of parasitic systems. Preservation of the pathogen as a biological species is impossible without evolutionary development, which is facilitated by genome instability and mutations, as well as expansion of the range of heterogeneity of the SARS-CoV-2 virus population due to circulation of both low- and high-virulence variants with subsequent stabilizing selection and formation of the epidemic variant of the pathogen. Therefore, the phase of reservation always balances on the border with the phase of epidemic transformation, when new strains capable of bypassing the protection previously formed by the human population, eluding protection from vaccines and post-infection immunity, emerge and gain advantage in natural selection.

### **The importance of genomic epidemiologic surveillance**

Molecular genetic monitoring makes it possible to anticipate changes in phenotypic properties affecting the epidemic process manifestation indicators and socio-economic consequences of such changes based on a more detailed study of the genetic characteristics of pathogens.

It is important to note that at the end of 2023, the volume of genomic sequencing has decreased worldwide, and this could possibly lead to the emergence of new variants without their detection for an extended period of time. A significant amount of data has been accumulated on evolutionary changes in the SARS-CoV-2 genome, taking into account new epidemiologic properties. Monitoring and genomic sequencing of the virus are important for the identification of new genetic variants and the development of public health strategies.

Genomic sequencing is increasingly being used to collect data on other pathogens, to investigate outbreaks of severe infectious diseases (cholera, Ebola, Dengue, bacterial meningitis, poliomyelitis, etc.) that may lead to public health emergencies, and to provide emergency medical care for critical epidemiologic situations. For example, the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) routinely uses genomic sequencing as an integral part of the zoonotic influenza outbreak response and pandemic preparedness package, and for seasonal influenza surveillance to develop seasonal vaccine recommendations and monitor antiviral susceptibility. GISRS has been used to incorporate SARS-CoV-2 virus into sentinel surveillance systems for influenza-like illnesses, acute respiratory infections, and severe acute respiratory infections to collect data to inform countries' national COVID-19 pandemic policies and responses<sup>1</sup>.

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

At the 74<sup>th</sup> Session of the World Health Assembly held on 30.05.2021, WHO Member States called for strengthening the role of genomic epidemiological surveillance in emergency preparedness and response, but there are problems related to the lack of necessary capacity and appropriate infrastructure for laboratory research. Only two-thirds of countries, including Russia, have the capacity to conduct genomic sequencing and ensure regular use of this powerful technology, while the remaining countries are only establishing genomic surveillance systems for pathogens with epidemic potential [21].

The 2022-2032 Surveillance Strategy, developed by WHO based on previous experience and lessons learned from the COVID-19 pandemic, relies on the special role of genomics in public health, which it plays due to the ability to utilize the results of genomic research in various fields of medicine. The strategy is not limited to a single pathogen or a specific epidemiologic threat. Rather, it aims to develop a unified vision for using genomics as a powerful complementary tool to address the public health challenges of preparedness and response to pandemics and epidemics across a broad spectrum.

### **Conclusion**

The new Global Strategy for Genomic Epidemiological Surveillance of Pathogens with Pandemic and Epidemic Potential notes that genomic epidemiological surveillance is making a significant difference to public health by providing a better understanding of the nature, evolution and pathways of infectious pathogens. Genomic data on pathogens with pandemic and epidemic potential, combined with clinical, epidemiologic and other data, are being used for risk assessment, development of vaccines, drugs and diagnostic tests, and decision-making on epidemiologic and social control measures. New technologies in sequencing and bioinformatics that have emerged in recent years have enabled a number of countries to make significant progress in building and strengthening their capabilities in this area.

The goal of genomic epidemiologic surveillance is to manage the epidemic process on the basis of systemic data on changes in the genetic properties of infectious pathogens with significant epidemic (pandemic) potential.

Objectives of genomic epidemiologic surveillance:

1. Operational and retrospective analysis of changes in the genetic properties of circulating and emerging pathogen variants, allowing dynamic tracking of the change of dominant gene variants.

2. Assessment of the influence of the structure of circulating pathogens taking into account the peculiarities of territorial distribution on the characteristics of the epidemic process.

3. Identification of predictors of the unfavorable epidemiological situation development on the basis of molecular genetic monitoring.

4. Predicting the development of the epidemic process of infectious diseases based on knowledge of changes in the genetic properties of the pathogen using innovative platform solutions and application of digital technologies.

5. Searching for and predicting new human and animal pathogens.

6. Developing rapid responses to emerging infections of epidemic and pandemic potential.

7. Management of the epidemic process through the development of implementation and adjustment of the system of preventive and anti-epidemic measures.

8. Creation of innovative vaccine and drug products.

Taking into account the above mentioned, Russia has made a significant step forward in the development of this scientific field. Genomic epidemiologic surveillance is a qualitatively new level of epidemiologic surveillance, taking into account the possibilities of studying genetic properties of infectious pathogens.

Thus, genomic epidemiologic surveillance, based on the knowledge of molecular genetic properties of infectious pathogens, is an essential component of biosecurity of the Russian Federation and a strategic area of scientific and technological development<sup>2</sup>.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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 иммунологии*. 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>
- Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Колосовская Е.Н. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по COVID-19 в Санкт-Петербурге. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 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>
- Семенов Т.А. Роль банка сывороток крови в системе биологической безопасности страны. *Вестник Росздравнадзора*. 2010;(3):55–8. Semenenko 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>
- Громашевский Л.В. *Общая эпидемиология*. М.;1965. Gromashevskii L.V. *General Epidemiology*. Moscow;1965.
- 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 Zoonthropozes*. Moscow;1964. EDN: <https://elibrary.ru/zgmuqr>
- 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.
- 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>
- 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.
- 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>
- WHO. *Strengthening Population Health Surveillance: A Tool for Selecting Indicators to Signal and Monitor the Wider Effects of the COVID-19 Pandemic*. Copenhagen; 2021.
- 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>
- 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>
- 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>
- 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

<sup>2</sup> Decree of the President of the Russian Federation of 28.02.2024 No. 145 "On the Strategy of Scientific and Technological Development of the Russian Federation".

- 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/dozjjs>
17. Akimkin V.G., Semenenko T.A., Ugleva S.V., 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>



**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* — Cand. Sci. (Biol.), Head, Genomic research laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

*Svetlana V. Ugleva*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Scientific and analytical department, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, [uglevas@bk.ru](mailto: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; *Semenenko 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

**Информация об авторах**

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

*Семененко 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* — к.б.н., зав. лаб. геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

*Углева Светлана Викторовна*<sup>✉</sup> — д.м.н., доцент, руководитель научно-аналитического отдела ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, [uglevas@bk.ru](mailto: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; *Семененко 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



# 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. Voronina<sup>1✉</sup>, Ekaterina A. Koroleva<sup>1</sup>, Marina S. Kunda<sup>1</sup>, Natalia N. Ryzhova<sup>1</sup>,  
Ekaterina I. Aksenova<sup>1</sup>, Lidia N. Kapotina<sup>1</sup>, Stanislava A. Nelyubina<sup>1</sup>,  
Anna V. Lazareva<sup>2</sup>, Nailya A. Zigangirova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>National 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, Fluorothiazinon, 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 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>

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

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

Воронина О.Л.<sup>1</sup>, Королева Е.А.<sup>1</sup>, Кунда М.С.<sup>1</sup>, Рыжова Н.Н.<sup>1</sup>, Аксенова Е.И.<sup>1</sup>, Капотина Л.Н.<sup>1</sup>, Нелюбина С.А.<sup>1</sup>, Лазарева А.В.<sup>2</sup>, Зигангирова Н.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Национальный 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/pmwtysz>

## Introduction

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common autosomal recessive diseases in which mutations in the gene for the transmembrane regulator of the chlorine channel cause impaired mucociliary clearance and the development of chronic colonization of the respiratory tract by bacteria of the *Pseudomonadota* phylum. Microorganisms of this phylum — *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia spp.* and *Achromobacter spp.* — are characterized by high natural resistance to antimicrobial drugs. Despite the use of aggressive antibiotic therapy, a progressive decline in lung function and early mortality are observed in CF patients with age. According to the latest edition of the Russian CF patient registry, the proportion of patients chronically infected with the listed bacteria is 33.6% for *P. aeruginosa*, 7.6% for *Achromobacter spp.* and 5.5% for *Burkholderia spp.* [1].

Penetrating the lower respiratory tract by aspiration, bacteria move along the surface of epitheliocytes using flagella and pili/fimbriae; these same structures serve as adhesins when attaching to cells to initiate biofilm formation [2]. Afterwards, several migration pathways of bacteria of these genera are possible: translocation through intercellular contacts and transepithelial migration [3]. In the latter case, invasion is first accomplished through the secretion systems of types 3 and 6 (T3SS, T6SS). The bacteria that have emerged from the epitheliocytes then cross the basal membrane and reach the connective tissue cells. On this pathway, they are protected by exotoxins that affect collagen and interfere with its antimicrobial activity [4]. *P. aeruginosa*, *Achromobacter spp.* and *Burkholderia spp.* can carry out invasion into macrophages, neutrophils and dendritic cells, thus being able to be protected from external influences in 4 types of eukaryotic cells. Bacteria not only survive inside cells, but can also disrupt their normal functioning, leading to pyroptosis/apoptosis or necrosis [5]. Cell death, bacterial escape and further multiplication cause an inflammatory response that damages lung tissue [3]. All the above mentioned stages in the life cycle of pathogens are coordinated by Quorum-Sensing (QS) signaling [6]. Survival mechanisms help these bacteria to compete with each other and with other representatives of the lung microbiome, so microbial diversity in such infections becomes minimal [7].

The eradication of such successful pathogens requires new approaches, one of which was used in the development of an innovative antibacterial drug of the thiadiazinone class (fluorothiazinone, FT) at the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology. T3SS effectors [8], as well as, presumably, highly conserved ATPases of the flagellar apparatus and T3SS, became a target for the effect of FT, which suppresses the pathogenicity of bacteria but does not kill them [8, 9], which ensures the absence of resistance development to such a drug. The efficacy of

FT *in vitro* and in animal models was shown against a number of Gram-negative bacteria: *Salmonella enterica*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* [10]. The drug inhibited the obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* [11], proving the possibility of FT penetration into eukaryotic cells.

Earlier, in the study of *P. aeruginosa* isolates from sputum and tracheal aspirate of CF patients, we showed that the cytotoxicity testing conditions selected for cultures isolated in nosocomial infections [9] were optimal only for isolates of genotypes ST235 and ST313 [12], characteristic of nosocomial *P. aeruginosa* belonging to the ExoU-lineage, named after the effector T3SS [13]. The other isolates were characterized by slow growth *in vitro* due to changes in cell physiology during chronic lung infection. Adaptation of experimental conditions to the peculiarities of *Pseudomonadota* of CF patients was one of the objectives of the study.

Considering the diversity of bacterial virulence factors used in adaptation and persistence in the respiratory tract of CF patients, we studied the genomic characteristics of isolates selected to evaluate the effect of FT and compared factors in the categories: motility, QS signaling, secretion systems, and exotoxins in selected representatives of *P. aeruginosa*, *Burkholderia spp.* and *Achromobacter spp.*

The objectives of our study were to comparatively analyze the virulence factors of 6 isolates of *Pseudomonadota* phylum bacteria infecting the lower respiratory tracts of CF patients and to test the efficacy of an innovative FT drug in suppressing the pathogenicity of bacteria *in vitro*.

## Materials and methods

### Materials

Six cultures of *Pseudomonadota* phylum bacteria were isolated from the sputum of chronically infected CF patients (Table 1). The study was conducted under the conditions of obtaining voluntary informed consent from patients or their legal representatives. The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 59 of 08.09.2023).

FT is a novel antibacterial drug of thiadiazinone class C19H17F2N3O4S: N-(2,4-difluorophenyl)-4(3-ethoxy-4-hydroxybenzyl)-5-oxo-5,6-dihydro-4H-[1,3,4]-thiadiazine-2-carboxamide<sup>1</sup>. A stock solution of FT was prepared from the substance with a concentration of 5.0 mM in 0.3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 7.0 ± 0.2.

<sup>1</sup> Clinical studies: RCT No. 389 dated 08/03/2018 (completed); RKI 169 dated March 14, 2022 (ongoing). Application for registration with the Ministry of Health of the Russian Federation (incoming No. 4253550 dated May 30, 2023). Status under review.

**Table 1.** Isolates of the *Pseudomonadota* phylum used in the study

Specie	Isolate	Accession number	Sequence type	Genome size, Mb	Genes	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

Cytotoxicity was studied on HeLa cervical carcinoma cells (ATCC CCL2, 22603).

### Bacteria cultivation

Bacteria were grown for 18 h at 37°C in LB broth to a concentration of 10<sup>9</sup> microbial cells/mL (OD<sub>600</sub>).

### Genome analysis

The protocol [14] was used for DNA extraction from isolates, supplemented by polysaccharide purification using CTAB (cetyltrimethylammonium bromide).

DNA libraries were prepared using the protocols Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina) and KAPA HyperPlus Kit (Roche). Sequencing was performed on a NextSeq 500/550 instrument (Illumina) using a Mid Output 300 cycles cartridge.

Genomes were assembled using CLC Genomic Workbench v. 21.0.1 (Qiagen) and SPAdes v. 3.13.0<sup>2</sup>. Rapid Annotations Subsystems Technology (RAST) [15] and NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [16] were used for annotation. Results were deposited in GenBank (bioproject PRJNA561493) under the numbers shown in Table 1.

Genomes were analyzed using BV-BRC resources<sup>3</sup> [17]. Virulence factors were investigated using VFDB<sup>4</sup> [18] and BlastKOALA<sup>5</sup> [19]. Plasmids were searched using PlasmidFinder 2.1<sup>6</sup>. CARD<sup>7</sup> [20], BV-BRC [17] and BlastKOALA [19] were used to identify resistance determinants.

### Investigation of the effect of FT in vitro

Bacterial cytotoxicity was determined according to the method [9], with modifications. A monolayer of HeLa cells grown in IMDM (Iscove's Modified Dul-

becco's Medium) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) and 2 mM L-glutamine in 96-well plates was washed and IMDM containing 1% FBS was added. HeLa cells were infected with bacterial cultures at an initial multiplicity of infection (MOI) of 5. Plates were incubated for 18 h in the presence of FT (60 µg/mL). 0.3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 7.0 ± 0.2, was used as a control. Cells were precipitated by centrifugation for 20 min at 1500 rpm. In the supernatants, the activity of released lactate dehydrogenase (LDH) was determined using the CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. The percentage of LDH release was calculated relative to uninfected control (0% LDH release) and HeLa cells lysed with Triton X-100 (100% LDH release).

The ability of FT to inhibit the swimming motility of isolates was evaluated on Petri dishes with 0.3% semi-liquid agar [21]. Bacterial cultures were incubated with FT (100 µg/mL) for 3 h at 37°C, then 2 µL of the suspension was added to the thickness of semi-liquid agar containing FT (100 µg/mL) and incubated for 48 h at 37°C. The degree of bacterial motility was determined by the diameter of radial migration in agar.

The following approach was used to study the effect of FT on bacterial biofilm formation. Static biofilms were formed on the abiotic surface according to the protocol [22] with changes in incubation conditions. FT (100 µg/mL) was added to overnight bacterial cultures at a concentration of 10<sup>7</sup> microbial cells/mL (OD<sub>600</sub>) and incubated in the wells of the plate for 48 h without changing the medium, then 125 µL of 0.1% crystal violet (CV) solution was added one at a time to stain the biofilms. The dye bound to the biofilms was extracted with 100 µL of 96% ethanol and OD<sub>540</sub> was determined on a Multiskan EX instrument (Thermo Labsystems). Qualitative studies of biofilms were performed under a Nikon Eclipse 50i microscope (Nikon) at 20× magnification.

Each FT experiment was repeated 3 times.

Statistical processing of the analysis results and visualization were performed using Prism-GraphPad (GraphPad Software). The criterion of statistical reliability of the difference between the obtained data was considered to be the error value  $p < 0.05$ .

<sup>2</sup> St. Petersburg genome assembler, Russia, URL: <http://cab.spbu.ru/software/spades/>

<sup>3</sup> Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, URL: <https://www.bv-brc.org>

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

<sup>5</sup> KEGG Orthology And Links Annotation, URL: <https://www.kegg.jp/blastkoala>

<sup>6</sup> URL: <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder>

<sup>7</sup> Comprehensive Antibiotic Resistance Database, URL: <https://card.mcmaster.ca>

## Results

### Genome analysis

Six isolates of the *Pseudomonadota* phylum represented 3 genera. *A. ruhlandii* and *A. xylosoxidans*, selected for the study, were representatives of the genus most common in CF patients in Russia. The choice of *B. cepacia* and *B. gladioli* was determined by the emergence of new species of *Burkholderia* spp. infecting CF patients against the background of decreasing spread of *B. cenocepacia* of epidemic genotype ST709 [23]. *P. aeruginosa* of different genotypes belonging to the ExoS lineage, according to E.A. Ozer et al. [13], were taken into the study as more common in infections of CF patients compared to the ExoU phenotype [12, 24].

The genomes of the isolates were represented by one chromosome in *Achromobacter* and *Pseudomonas* and 3 chromosomes in *Burkholderia*. The 48 Kb conjugative plasmid was present only in the genome of *A. ruhlandii* (IncP1), but did not include resistance determinants. The size of *Burkholderia* genomes was one-third larger than *Achromobacter* and *Pseudomonas* genomes (Table 1). In all genomes, 92-98% of the identified genes encoded proteins.

When assessing the resistance potential of the studied isolates, the number of efflux systems encoded by genomes was noteworthy: 12 in *P. aeruginosa*, 16 in *Achromobacter* spp. each, 27 in *B. cepacia*, 38 in *B. gladioli*, which creates additional opportunities to counteract the applied antibiotic therapy.

Investigating the virulence factors of isolates, we focused on 4 main groups necessary for bacterial adaptation to lower respiratory tract conditions: secretion systems, motility, toxins, and QS signaling.

The secretion systems (Table 2) Sec, SRT, Tat, and T2SS are represented by all components in the genomes of the isolates. T3SS is found in all isolates except *B. cepacia*; T6SS is found in 5 isolates, and in *A. ruhlandii* it contains only genes of secreted substrate Hcp and

inner membrane protein *IcmF*; finally, complete T1SS is found in *B. gladioli*, and in the other isolates it is represented only by outer membrane protein *TolC*.

The main motility apparatus, the flagella apparatus, is present in the genomes of all isolates. The identified hfp pili/fimbriae differed in composition among the isolates. As shown in Table 3, pili responsible for twitching motility and chemosensory activity were found only in the genomes of *P. aeruginosa*. Type IV pili are present in pseudomonads and *Burkholderia* spp. but differ in the list of components, and in *Achromobacter* they are represented only by the prepilin *pilD* peptidase. Type IVb pili are present in all isolates. Chaperone-usher pili, which encode 2 different operons: *fimACD* and *cupE1-6*, are present in *P. aeruginosa* and *B. cepacia* with a complete set of components. In *B. gladioli*, the *fimACD* operon lacks a chaperone gene and the *cupE* operon is not detected. In *Achromobacter* genomes, the full *cupE1-6* operon is present, while the *fimACD* operon lacks the gene encoding pilin.

The QS system as the most important means of bacterial communication is represented in the analyzed genomes in all its diversity. QS of AI-1 type (AutoInductor), whose signaling molecules are homoserinlactone derivatives, was found in the genomes of *P. aeruginosa* (2 each) and *Burkholderia* (1 each). An AI-1-regulated operon of rhamnolipid biosynthesis is also present in these genomes. Rhamnolipids are included in the QS system, are used by bacterial cells to reduce surface tension, and are important for motility, biofilm formation, and absorption of hydrophobic substrates [25].

The second system is named DSF from signaling molecules which are diffusible signaling factors. For *Burkholderia* spp. this BDSF is cys-2-dodecenoic acid. Another name for it is *rpfF/R/B/G* — by genes. *Achromobacter* genomes have 2 DSF systems each, *B. cepacia* has 1 DSF. The genomes of *P. aeruginosa* and *B. gladioli* have only *rpfB* genes.

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

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	+

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

**Table 3.** Pilus systems in the genomes of the studied isolates

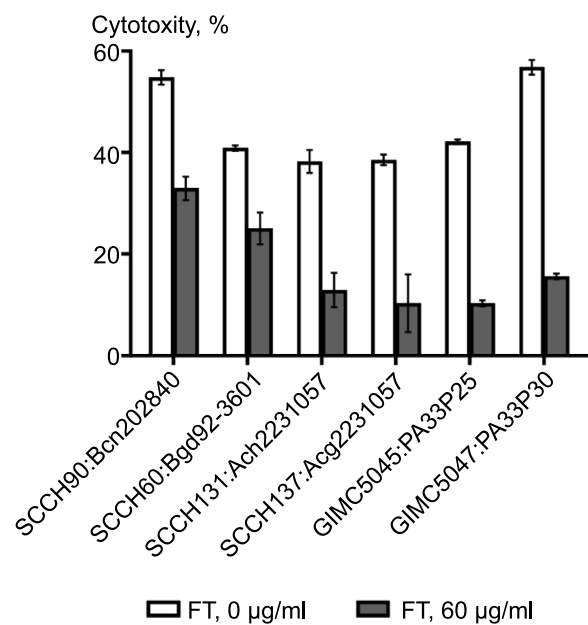
Pilus systems	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5045:PA33P25	<i>P. aeruginosa</i> GIMC5047:PA33P30	<i>B. cepacia</i> SCCH90:Bcn202840	<i>B. gladioli</i> SCCH61:Bgd92-3601	<i>A. ruhlandii</i> SCCH137:Ach2231057	<i>A. xylosoxidans</i> SCCH131:Ach223717
Twitching motility pili	pilGHIJKRSTUKRS	pilGHIJKRSTUKRS	-	-	-	-
Chemotensory pili	chpABCDE	chpABCDE	-	-	-	-
Type IV pili	pilABCDPQONMZVWXY1Y2E	pilABCDPQONMZVWXY1Y2E	pilABCDEQW	piiABCDEW	pilD	pilD
Type IVb pili	fip, cpaABCEF	fip, cpaABCEF	fip, cpaABCEF	fip, cpaABCEF	fip, cpaABCEF	fip, cpaABCEF
Chaperone-Usher Pathway (CUP) pili	fimACD, cupE	fimACD, cupE	fimACD, cupE	fimAD	fimCD, cupE	fimCD, cupE
Positive phototactic motility proteins	-	-	-	-	pixH	-

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

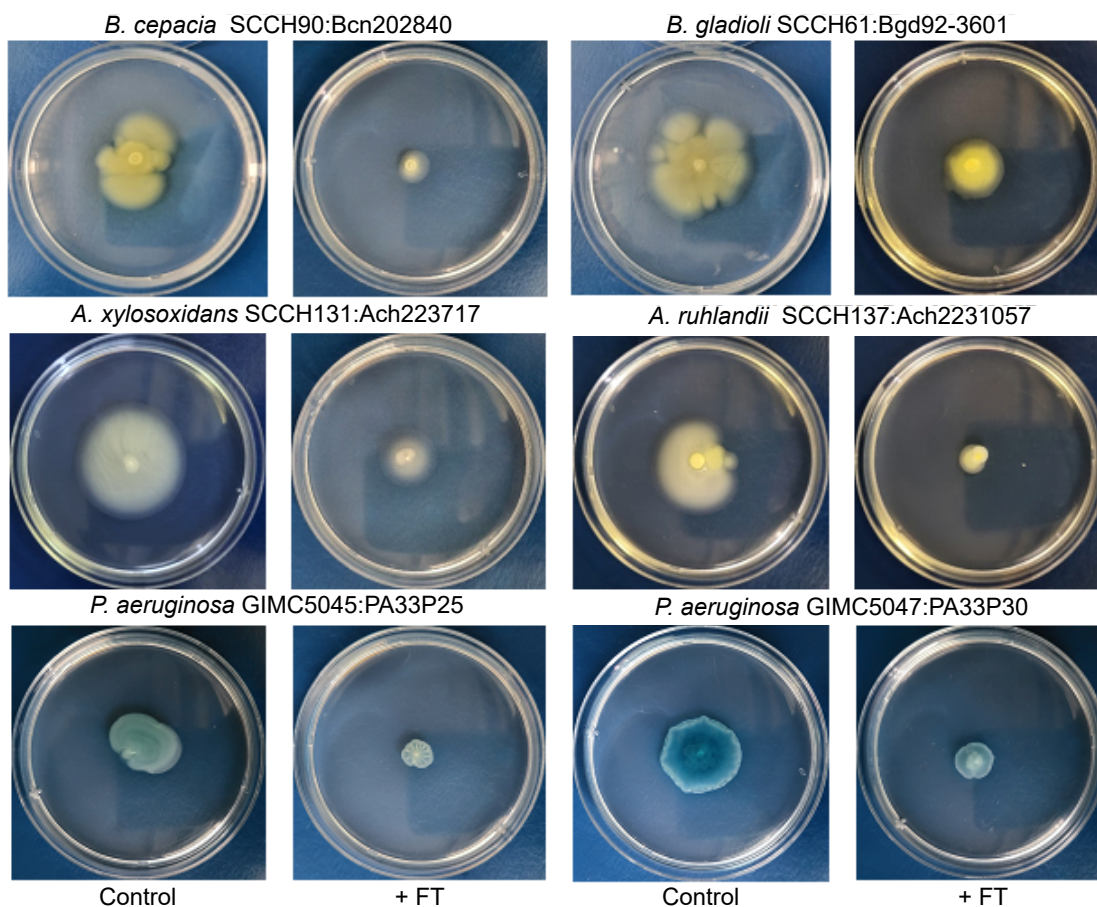
The third system, PQS (pseudomonas quinolone signal), whose signaling molecule is 2-heptyl-3-hydroxyl-4-quinolone (C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>), in the complete set: pqsABCDHE, *phnAB*, is present only in *P. aeruginosa*. The genome of *B. cepacia* contains pqsE, a gene for a protein that responds to quinolone signaling, and *phnAB*, encoding an anthrenylate synthesis protein, a precursor of PQS [26]. *Achromobacter* and *B. gladioli* have only *phnAB*.

The toxins that the studied isolates are capable of producing can be divided into 4 groups. The first one is T3SS toxins acting inside the eukaryotic cell. In the genome of *P. aeruginosa* GIMC5045:PA33P25 they are represented by 5 genes: *toxA*, *exoS*, *exoT*, *exoY*, *zot*. The *toxA* gene encodes an ADP-ribosyltransferase. The *zot* gene is a homolog of cholera toxin acting on zonula occludens (the main one of the tight contacts proteins of the intestinal epithelium), the second isolate of *P. aeruginosa* has 4 genes of this group. The T3SS effector gene was also found in the genomes of *Achromobacter* — *axoU*. The second group contains genes of toxins that damage the membrane of eukaryotic cells. The genes of phospholipase C and hemolysin III are present in all genomes, the gene *tlyC* (pore-forming toxin) is absent in *Achromobacter*, and the genome of *B. cepacia* contains another gene of this group, *tlh*, encoding thermolabile hemolysin. In the third group of nonspecific toxins, only *P. aeruginosa* has *hcnABC* (hydrogen cyanide synthase) genes. The fourth group of toxins damaging the extracellular matrix is found only in *B. cepacia* and is represented by the *colA* gene of microbial collagenase.

*Effect of FT in vitro*



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



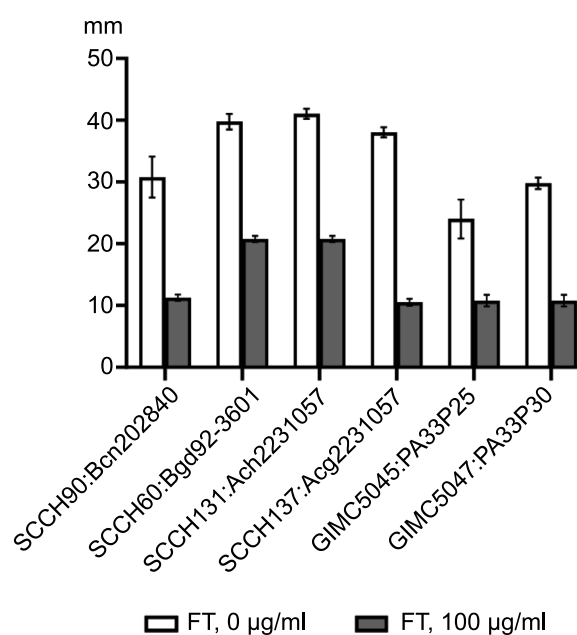
**Fig. 2.** Effect of FT on swimming mobility of bacterial cells.

The effect of FT on the cytotoxicity of isolates from CF patients was investigated by selecting the time of contact of bacterial cells with HeLa cells, taking into account the slow growth of such bacteria in culture. While at a contact time of 4 h at doses of 10 and 50 MOI the cytotoxicity of isolates was 16–26 and 27–43%, respectively, after 20 h of contact the toxicity rose to 70–100%. A dose of 5 MOI and a contact time of 18 h were determined as optimal for studying the effect of FT. Under the influence of FT there was a decrease in cytotoxicity for all isolates: for *P. aeruginosa* isolates — by 3.6 and 4.0 times, for *B. cepacia* — by 2.6, for *B. gladioli* — by 3.2, for *A. xylosoxidans* — by 3.0, for *A. ruhlandii* — by 3.7 (**Fig. 1**).

Comparison of the swimming mobility of isolates showed a significant reduction of the bacterial movement zone under the influence of FT: for *P. aeruginosa* — 2.2 and 2.8 times, for *B. cepacia* — 2.7 times, for *B. gladioli* — 2.0 times, for *A. xylosoxidans* — 2.0 times, for *A. ruhlandii* — 3.6 times (**Fig. 2**). The mobility of *P. aeruginosa* isolates in the control was lower than other bacteria, however, the difference with samples incubated with FT was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

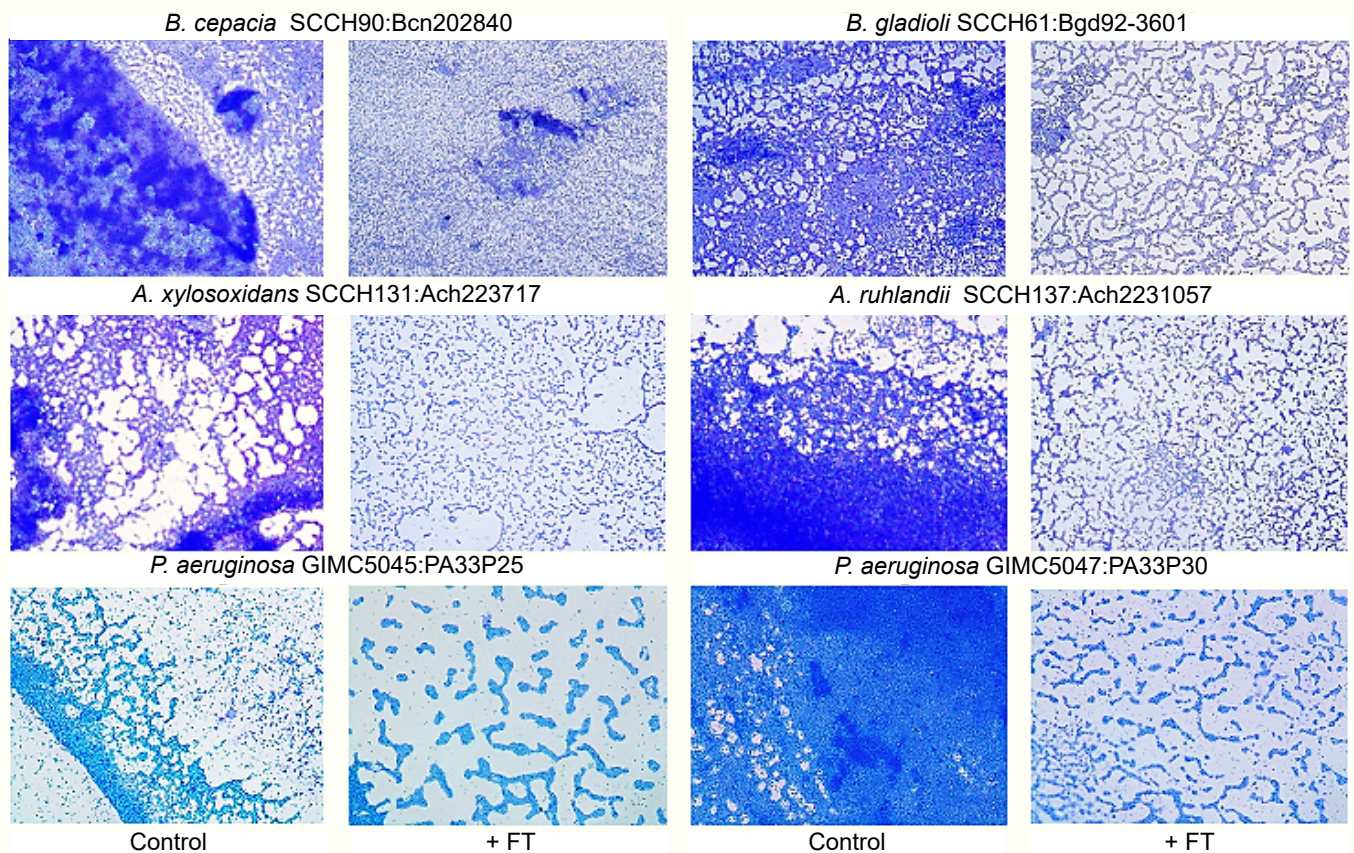
The process of biofilm formation differed among isolates of 3 genera (**Fig. 3**). *Burkholderia* and *Achromo-*

*bacter* were characterized by a fairly rapid development of dense biofilm structures over the entire well area, while for *Pseudomonas* biofilm formation was slower and was



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





**Fig. 4.** Effect of FT on the formation of bacterial biofilms.

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

mainly concentrated at the edges of the well, where a dense ring was formed (**Fig. 4**). The effect of FT was strongest for *B. cepacia*. The biofilm biomass decreased 7.7-fold in the presence of the antibacterial agent. For the other isolates the decrease in biomass was lower but significant: for *A. xylosoxidans* and *A. ruhlandii* — 3-fold, for *B. gladioli* — 2.3-fold, for *P. aeruginosa* — 2.4-fold and 2.0-fold (**Fig. 5**).

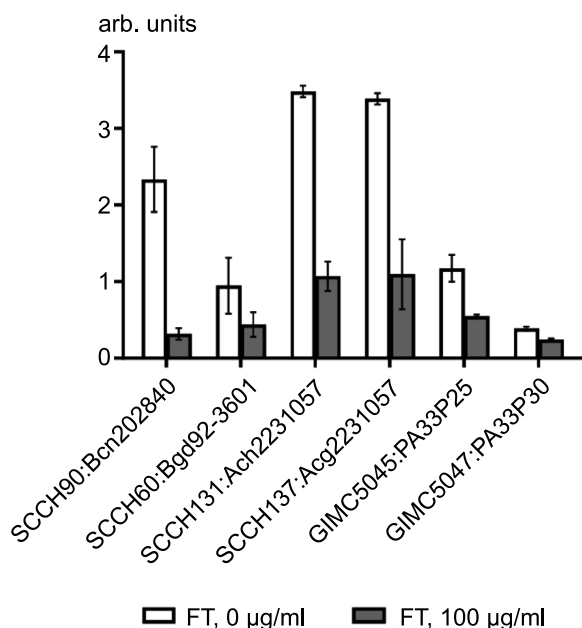
## Discussion

Respiratory tract infections with *P. aeruginosa*, *Achromobacter spp.* and *Burkholderia spp.* are the most frequent and most dangerous for CF patients. Multiple natural resistance of the *B. cepacia* complex is already postulated and warnings about it are stated in the EUCAST antibiotic susceptibility testing guidelines<sup>8</sup>. The antibiogram for *Achromobacter spp.* is also a definite challenge for laboratories, as EUCAST thresholds are only given for 3 substances, even in the 2024 guidelines. For *P. aeruginosa*, the problem is that sensitive *in vitro* isolates cannot be eradicated with selected drugs. Our genomic studies have shown that the potential for

resistance in *P. aeruginosa* and other bacteria studied may be the efflux systems present in genomes in large numbers. We should not forget about biofilms, the formation of which is successfully coordinated by QS signals, the presence and diversity of which we confirmed for all genomes studied. *In vitro* experiments showed that all 6 isolates formed dense biofilms. It is these structures that help bacteria avoid the effects of antibiotics in human lungs. However, the innovative FT drug was effective against all isolates tested.

Cytotoxicity of representatives of three genera is a serious problem for lung tissues of CF patients. The spectrum of exotoxins that can be produced by the studied isolates is quite wide. It should be noted that in the study of the proteomes of *P. aeruginosa*, *Achromobacter spp.* and *Burkholderia spp.* there are still many surprises and discoveries awaiting us, since at present it is possible to annotate a little more than half of the translation products that encode the genomes we have sequenced. The leader in annotation is *P. aeruginosa* (57.8%), with *B. gladioli* in last place at 38.2%. The databases of annotation resources lack, for example, the sequences of genes encoding the *Achromobacter spp.* T3SS effector, so we performed an additional search for the axoU gene, finding it in both *Achromobacter* genomes, named the hypothetical protein gene. For *B. gladioli*, the search for T3SS effectors is ongoing.

<sup>8</sup> Antimicrobial susceptibility testing of Burkholderia cepacia complex (BCC). 2013. URL: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/BCC\\_susceptibility\\_testing\\_130719.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/BCC_susceptibility_testing_130719.pdf)



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

S.K. Yadav et al. found the ortholog of the T3SS effector in *B. gladioli* strain NGJ1, showing the presence of a secretion signal at the N-terminus of a polypeptide annotated as a prophage protein, and demonstrated its calcium-dependent secretion mediated by T3SS [27]. The frame of such a protein is also present in the genome sequenced by us as part of the prophage. During *in vitro* experiments, all 6 isolates tested showed cytotoxicity against HeLa cells. The cytotoxicity of *B. cepacia* was at the level of the most effective *P. aeruginosa* isolate in the absence of T3SS, as shown by our genomic studies. It should be noted that the first publication mentioning the absence of T3SS in *B. cepacia* dates back to 2001. [28]. It is possible that another nanomachine, T6SS, is involved in the delivery of *B. cepacia* toxins, especially since in other bacteria T6SS and T3SS work in coordination [29].

Genomic studies have demonstrated an arsenal of factors responsible for motility of the studied bacteria of the *Pseudomonadota* phylum. The main one for swimming motility is flagella, the genes of which apparatus are present in all genomes. We observed this type of motility in the isolates tested, more pronounced in *B. gladioli* and *Achromobacter* under experimental conditions.

### Conclusion

Thus, genomic studies and *in vitro* analysis of isolates allowed us to describe the virulence factors of 6 bacteria isolated from chronically infected patients and to demonstrate the possibility of their realization by all isolates for important processes in the development and chronicity of infection: cytotoxicity, motility and biofilm formation.

The innovative antibacterial agent FT inhibited the three processes in all isolates *in vitro*. The efficacy of FT against isolates from CF patients has been shown for the first time. These experiments will serve as a basis for further preclinical trials of the drug against a new nosology, including animal models. Ongoing comprehensive studies of FT itself have demonstrated accumulation of the drug administered intragastrically to rats in various animal organs, including the lungs [10]. Thus, the evidence base for the efficacy of FT *in vivo* and *in vitro* is constantly expanding, which gives hope that a new helper in the prevention and treatment of respiratory tract infections in CF patients may emerge.

### 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](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9409-7_3)
7. Pickrum A.M., DeLeon O., Dirck A., et al. Achromobacter xylosoxidans 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/izwtaj>
  13. Ozer E.A., Nnah E., Didelot X., et al. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of exoU<sup>+</sup> and exoS<sup>+</sup> 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
  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 resistance 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/aqqxex>
  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., Kovacic 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>

### 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](mailto:olv550@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

**Ekaterina A. Koroleva** — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of chlamydia, 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 chlamydia, 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 chlamydia, 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 chlamydia, 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

### Информация об авторах

**Воронина Ольга Львовна** — к.б.н., доцент, зав. лаб. анализа геномов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, [olv550@gmail.com](mailto: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 НИИЦ 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

Original Study Article

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

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

Olga A. Osadchaya<sup>1✉</sup>, Dmitry E. Kireev<sup>1</sup>, Daria V. Saleeva<sup>1</sup>, Alina A. Kirichenko<sup>1</sup>, Ilya A. Lapovok<sup>1</sup>, Alexey E. Lopatukhin<sup>1</sup>, Anastasia V. Shlykova<sup>1</sup>, Leila F. Makhmudova<sup>1</sup>, Natalia N. Ladnaya<sup>1</sup>, Ermis M. Hovakimyan<sup>2</sup>, Siranush V. Martoyan<sup>2</sup>, Hovsep K. Kazaryan<sup>2</sup>, Tamara V. Hovsepyan<sup>2</sup>, Narina K. Sargsyants<sup>2</sup>, Vadim V. Pokrovsky<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>National 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.

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., Akimkin V.G. 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>

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

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

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

<sup>2</sup>Национальный 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>

## Introduction

The Republic of Armenia is a country in Eastern Europe and Central Asia (EECA) that has been actively engaged in the fight against HIV/AIDS over the past decades. According to the United Nations Global Statistics on HIV/AIDS (UNAIDS), there were 1.8 million people living with HIV in EECA as of 2021, and the number of new infections continues to increase<sup>1</sup>.

After the collapse of the Soviet Union, a period of economic collapse severely weakened the health infrastructure of the newly independent republics. At that time, little attention was paid to the HIV-1 epidemic. Much of the former Soviet Union was experiencing one of the fastest growing HIV-1 epidemics in the world, with the number of infected individuals doubling annually in certain regions [1]. Open border policies in the regions did not prevent migration, which in turn facilitated the spread of infectious diseases<sup>2</sup>. Research results show that among Armenian citizens the highest HIV-1 prevalence was recorded among migrant workers [2, 3].

One of the main reasons for the increase in HIV-1 infections in Armenia was the low level of access to antiretroviral therapy (ART). However, in low- and middle-income countries, ART was introduced only in the mid-2000s [4]. Thanks to the efforts of the World Health Organization (WHO) in the early twenty first century, the inequality between rich and poor countries in terms of treatment options decreased. Developing countries were able to purchase drugs at affordable prices, which in turn reduced mortality. During this period, the first guidelines for HIV-1 treatment in resource-limited settings were published, which contained simplified treatment regimens [5].

At present, the incidence of HIV infection in Armenia is low. The total number of infected cases does not exceed 4,600 people, which is only 0.12% of the country's population<sup>3</sup>. Much like in other countries, programs in Armenia are aimed at achieving the goals of UNAIDS. As a result of the "90-90-90" strategy, a good result was achieved in the region — in 2020, 81% of people living with HIV knew their status and 86% of people who were prescribed ART achieved an undetectable viral load<sup>4</sup>. As of 2018, the preferred treatment regimen includes the integrase inhibitor (INI) dolutegravir in combination with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) — tenofovir, lamivudine or emtricitabine. An alternative regimen is two NRTIs

(tenofovir and lamivudine) and one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) drug, efavirenz<sup>5</sup>.

Due to the increasing number of patients on ART, the development of viral resistance is a significant challenge in combating the HIV epidemic. WHO recommends drug resistance testing prior to treatment initiation and when ART is ineffective. Unfortunately, this approach is not available to all countries. In most developing countries, only certain groups of patients are tested and only in cases of virological failure of ART<sup>6</sup>.

HIV resistance testing is also recommended for epidemiologic surveillance of drug resistance (DR) [6]. According to WHO reports, the prevalence of transmitted DR for 2017 and 2020 has exceeded the 5% threshold in most countries, with 67% of countries exceeding 10%. The presence of HIV-1 DR in naive patients reduces the selection of effective ART and may increase the risk of virologic treatment failure [7].

Previously published studies have investigated the prevalence of HIV-1 DR in Armenia in untreated patients and reported a significant increase in resistance. While in 2015 the resistance rate was only 1.5%, in the 2020 and 2021 studies, the prevalence of DR increased to 5.5% and 9.2%, respectively, and approached the WHO 10% threshold, upon reaching which clinical treatment guidelines should be revised [8–10]. However, the 2022 publication indicated a decrease in DR in naive patients to 7.5% in 2020–2021 [11]. Previous studies of HIV-1 DR were characterized by small sample sizes and therefore had limited reliability of results.

**The aim** of the scientific research is to assess the prevalence and pattern of HIV-1 drug resistance in the Republic of Armenia by analyzing a large cohort of patients with no history of taking antiretroviral drugs.

## Materials and methods

The collection of biological material and related patient information took place in 2018–2022. A total of 982 patients who had not previously received ART participated in the study. Patients were included consecutively during routine visits to the Republican AIDS Prevention Center of the Ministry of Health of the Republic of Armenia. Demographic and clinical data collected included age, sex, date of first positive immune blot, presumed HIV-1 transmission route, HIV-1 RNA viral load and CD4<sup>+</sup> cell count.

Samples were analyzed by mass parallel sequencing using a laboratory technique developed at the Cen-

<sup>1</sup> UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet 2022. URL: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet>

<sup>2</sup> UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet 2019. URL: <https://www.unaids.org/ru/resources/fact-sheet>

<sup>3</sup> 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](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC3032_AIDS_Data_book_2021_En.pdf)

<sup>4</sup> UNAIDS DATA, 2021. URL: [https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021\\_unaids\\_data](https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021_unaids_data)

<sup>5</sup> Monitoring for procurement of drugs for HIV and HCV treatment; development of solutions to optimize the situation in order to promote uninterrupted access to drugs in the Republic of Armenia, 2020. URL: [https://itpc-eecca.org/wp-content/uploads/2020/11/armenia\\_monitoring\\_final\\_05.11.2020.pdf](https://itpc-eecca.org/wp-content/uploads/2020/11/armenia_monitoring_final_05.11.2020.pdf)

<sup>6</sup> 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>

tral Research Institute of Epidemiology ( $n = 367$ ) or by classical Sanger sequencing using the AmpliSense HIV-Resist-Seq reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology) ( $n = 615$ ). If mass parallel sequencing was used, three viral genes were analyzed: protease, reverse transcriptase and integrase. If Sanger sequencing was used, the nucleotide sequences of the protease gene and a fragment of the reverse transcriptase gene, in which resistance mutations may appear, were obtained. Sequencing was performed using MiSeq (Illumina) and Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) instruments.

Preliminary HIV-1 subtyping was performed using the online tools REGA v. 3.0<sup>7</sup> and Stanford University database<sup>8</sup>. The results of preliminary subtyping were verified by phylogenetic analysis using the MEGA v. 6.0 software with reference sequences of HIV-1 subtypes and recombinant forms downloaded from the Los-Alamos database<sup>9</sup>. Nucleotide sequence alignment and further editing were performed using BioEdit v. 7.2<sup>10</sup>.

The quality of nucleotide sequences was assessed using the WHO HIV DR v. 2.30<sup>11</sup> and Calibrated Population Resistance Tool<sup>12</sup>.

DR to antiretroviral drugs were identified using the Stanford University database. Surveillance drug resistance mutations (SDRM) were identified using WHO Surveillance Drug Resistance Mutation Worksheet 2014.

The study was conducted with the informed consent of the patients. The study was approved by the local ethical committee of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor (Moscow, Russia) on May 21, 2019 (protocol No. 92).

## RESULTS

### *Characteristics of the study group*

The mean age of participants at the time of inclusion in the study was 41 (19–75) years, with the largest number of people with HIV infection being aged 30–40 years; 68.9% of patients were male. Heterosexual transmission was predominant (83.2%) as the most likely route of transmission in the study group.

Subtyping results showed a high degree of genetic diversity among the variants circulating in the study region. HIV-1 sub-subtype A6 was predominant with a prevalence of 87.0%, with subtype B being the next most frequent (5.9%). Subtypes A1, C and G were also

detected in isolated cases. In addition, 6 different recombinant forms were detected – CRF02\_AG, CRF03\_A6B, CRF06\_cpx, CRF20\_BG, CRF24\_BG and CRF63\_02A6, which are frequently found in EECA countries.

The epidemiologic data of the study participants are presented in **Table 1**. A 95% confidence interval (CI) was calculated for each epidemiologic group.

### *Assessment of prevalence of DR to antiretroviral drugs and resistance mutations*

We analyzed 982 nucleotide sequences for HIV-1 DR to NNRTI, NRTI, and PI class antiretroviral drugs and 367 nucleotide sequences for HIV-1 DR to PI class drugs.

The overall prevalence of HIV DR to all drug classes was 13.8% (95% CI 11.8–16.2%). DR to individual antiretroviral drug classes occurred at a frequency of 2.0% (95% CI 1.3–3.1%) to PIs, 1.4% (95% CI 0.8–2.4%) to NRTIs, 11.2% (95% CI 9.4–13.3%) to NNRTIs, and 0.5% (95% CI 0.02–2.1%) to INIs. Details of the prevalence of DR to each drug separately are presented in **Figure 1**.

HIV DR was most frequently registered for the drug rilpivirine of the NNRTI class — in 9.7% of cases, but in 7.6% of cases it was low-level resistance. To other drugs of this class, nevirapine and efavirenz, DR was detected in 4.2 and 3.5% of cases, respectively, and it was mostly high-level resistance. Resistance to antiretroviral drugs of NRTI, PI and INI classes individually did not exceed 2%.

HIV-1 surveillance drug resistance mutations (SDRM) detected in more than one patient are presented in **Table 2**.

Surveillance mutations associated with DR to PI class antiretroviral drugs were detected in only two cases — in one patient E92G and in the second patient Y143H.

The overall prevalence of HIV-1 surveillance DR mutations was 1.4% (95% CI 0.8–2.4%) to PI class antiretroviral drugs, 1.5% (95% CI 0.9–2.5%) to NNRTI class, 3.1% (95% CI 2.1–4.3%) to NNRTI class, and 0.6% (95% CI 0.02–2.1%) to INI class.

### *Dependence of resistance prevalence on the analyzed indicators of the study sample*

In this study, we researched the dynamics of the prevalence of DR to antiretroviral drugs of different classes depending on the year of the first positive immunoblot test. To obtain comparable cohort sizes, groups of patients with detected HIV infection were formed: up to and including 2017 (146 people), in 2018 (241 people), in 2019 (332 people), in 2020 (81 people) and in 2021 (182 people). The results of the analysis are presented in **Figure 2**. The dynamics of the overall prevalence of HIV-1 DR to antiretroviral drugs was largely driven by DR to NNRTI class an-

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

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

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

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

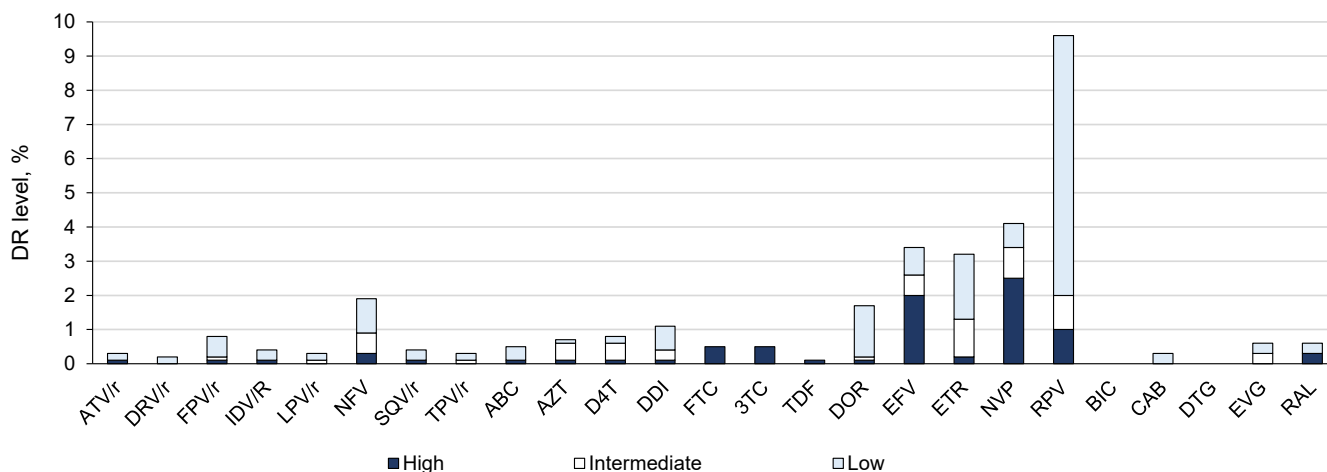
<sup>11</sup> URL: [https://sequenceqc.bccfe.ca/who\\_qc](https://sequenceqc.bccfe.ca/who_qc)

<sup>12</sup> URL: <https://hivdb.stanford.edu/cpr>



**Table 1.** Epidemiological characteristics of patients included in the study, *n* (%; 95% CI)

Characteristics	Men	Women	All
Number of patients	677 (68.9; 66.0–71.8)	305 (31.1; 28.2–34.0)	982
<b>Transmission risk group of infection</b>			
Heterosexual	514 (52.3; 49.2–55.5)	303 (30.9; 28.0–33.8)	817 (83.2; 80.7–85.4)
Men who have sex with men	98 (10.0; 8.3–12.0)	–	98 (10.0; 8.3–12.0)
Injecting drug users	65 (6.6; 5.2–8.4)	2 (0.2; < 0.01–0.8)	67 (6.8; 5.4–8.6)
<b>HIV-1 genetic variants</b>			
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_cpx	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)

**Fig. 1.** Frequency of occurrence and level of resistance to antiretroviral drugs.

tiretroviral drugs. During the study period, a slight upward trend of DR in the country was noted. It should also be noted that since 2020, a significant proportion of patients started to receive dolutegravir in the first-line therapy regimen of antiretroviral drugs from the INI group, and the share of such patients increased from 30% to 80% by the end of 2021 [8, 11]. This is possibly associated with the emergence of isolated cases of virus resistance to antiretroviral drugs of this class in 2019–2020.

The association between the prevalence of HIV-1 DR to antiretroviral drugs and genetic variants of the virus was analyzed. Among variants occurring in more than 1% of cases, subtype B viruses were the most frequently resistant, showing DR in 36.2% of cases (in 21 patients out of 58). DR prevalence above average was

also reported in patients infected with CRF63\_02A6, 15.4% (in 4 patients out of 26). DR detection rates below average were found in patients with sub-subtype A6, 11.5% (in 98 patients out of 854) and CRF02\_AG, 9.1% (in 3 patients out of 22).

The prevalence of HIV-1 DR to antiretroviral drugs was recorded almost one and a half times more frequently in men than in women, 15.4% versus 10.5% ( $p = 0.041$ ). Analysis of the prevalence of resistance according to the perceived risk group showed that resistant variants were found most frequently among men who have sex with men (27.6%, 27 out of 98), followed by injection drug users (17.9%, 12 out of 67). Drug-resistant viruses were least frequently detected among patients infected during heterosexual contact (11.9%, 97 of 817).

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

Surveillance DR mutations	Patients count	Prevalence mutations, % (95% CI)
<b>Mutations NNRTI</b>		
<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)
<b>Mutations NRTI</b>		
<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)
<b>Mutations PI</b>		
<i>D30N</i>	2	0.2 (< 0.001–0.8)
<i>M46I</i>	6	0.6 (0.2–1.4)

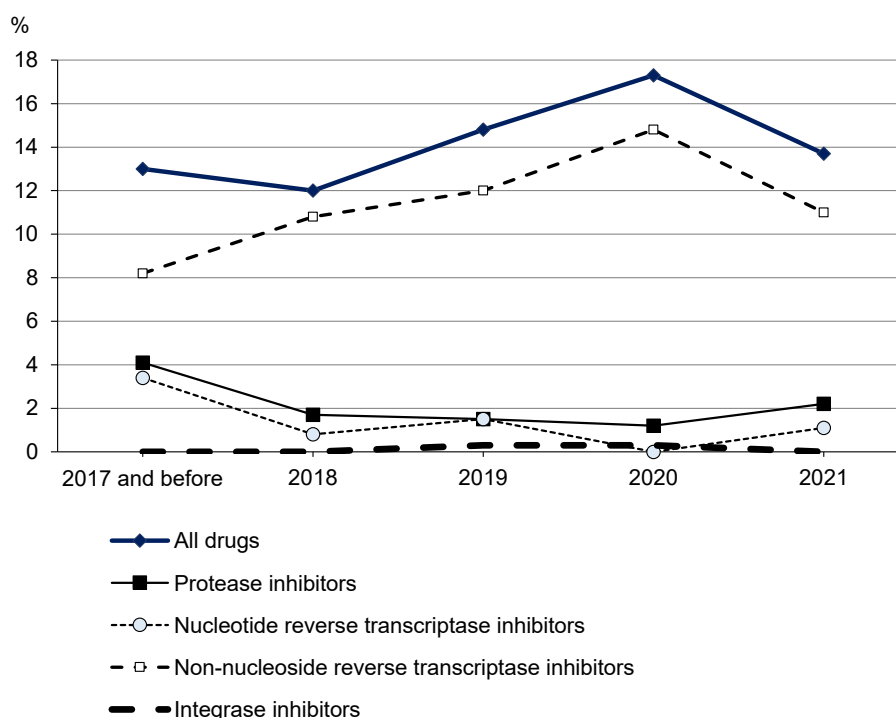
At the final stage, the prevalence of HIV-1 DR to antiretroviral drugs in different regions of Armenia was analyzed. All of them were divided into three groups: Yerevan city; regions adjacent to Yerevan; regions distant from Yerevan. The results are presented in **Table 3**.

In certain regions, such as Syunik and Tavush, the prevalence of HIV-1 DR was the highest. However, on average, the prevalence rates in nearby and remote regions were lower than in the capital city, being 12.7% and 12.6%, respectively.

## Discussion

This study is a national epidemiologic investigation of HIV-1 DR in the Republic of Armenia using a large sample of naive patients. The overall prevalence of DR to antiretroviral drugs was 13.8% and was slightly higher than described in other studies. Research groups that have previously studied HIV resistance in patients with no prior experience of taking ART have shown prevalence ranging from 5.5% to 9.2% [9–11]. However, it should be taken into account that in these studies, DR was not assessed to all antiretroviral drugs. In particular, according to previous studies, resistance to antiretroviral drugs of the NNRTI group ranged from 4.4% to 6.0%; in our study, this indicator increased to 11.2% [9, 11]. This significant difference was obtained due to the fact that the HIV-1 DR to rilpivirine was taken into account in our study. In the previous study [11], the resistance rates to EFV and NVP were 6% and 6.8%, while in the current study they were 3.5% and 4.2%, respectively [9, 11].

Antiretroviral drugs of the NNRTI group have a low genetic barrier, and a single point substitution in reverse transcriptase can lead to the development of high-level resistance and subsequently to the transmission of resistant variants with alterations into the population. Therefore, mutations that significantly reduce sensitivity to nevirapine and efavirenz continued to persist among patients in this class. As primary resistance testing is not routinely performed in the region, and due to the 2018 WHO guidelines, a combination of 2 NRTIs + 1 INI was started in the first-line therapy regimen. Nevirapine was removed from the list of



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

**Table 3.** Prevalence of HIV-1 DR in the regions of Armenia

Region	Patients count	Patients with drug resistance count	Prevalence, %
Yerevan	278	47	16.9
<b>Nearby regions</b>			
Aragatsonion	34	4	11.8
Armavir	79	12	15.2
Ararat	94	11	11.7
Kotay	77	9	11.7
<b>Remote regions</b>			
Vayodzor	18	1	5.6
Gegharkunik	96	10	10.4
Lori	91	11	12.1
Syunik	68	12	17.6
Tavush	30	6	20.0
Shirak	117	13	11.1

drugs for HIV-1 treatment in Armenia, and efavirenz was recommended for prescription as part of an alternative regimen.

At the same time, a low prevalence of DR was recorded in relation to NRTI, PI and INI classes. The rate of DR to NRTI drugs decreased significantly from 5.0% to 1.4% [10, 11]. The most frequently detected substitutions in patients were those causing high levels of DR to lamivudine and emtricitabine.

In our study, for the first time in the Republic of Armenia, the efficacy of INI class drugs in those who have not undergone ART was evaluated and resistance mutations were identified that significantly reduced sensitivity to raltegravir and partially to elvitegravir.

The results showed that drug combinations used in 1st line therapy are effective, and this is supported by data on the increase in undetectable viral load in individuals receiving ART from 68% in 2016 to 86% in 2020<sup>13</sup>. However, regimens containing efavirenz and nevirapine should be cautiously prescribed or minimized, as the proportion of circulating drug-resistant variants of the virus to each of the drugs is quite high, at approximately 4%<sup>14</sup>.

<sup>13</sup> 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> (Accessed: 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> (Accessed: 05.08.2022).

<sup>14</sup> International Treatment Preparedness Coalition Monitoring the Procurement of Drugs for the Treatment of HIV Infection and HCV. Development of Solutions to Optimize the Situation

The overall prevalence of mutations important for surveillance did not exceed 5% for any of the antiretroviral drugs classes individually and was highest for the NNRTI class (3.1%).

In our study, associations between the presence of drug resistance and various virus and patient characteristics were analyzed. It was found that the probability of resistance was much higher in case of infection caused by subtype B virus. Drug-resistant variants were registered more often in male patients, from the risk group of men having sexual contacts with men, living in Yerevan city.

The prevalence of HIV-1 variants with high-level resistance increases the risk of primary DR transmission. Therefore, estimation of the prevalence of transmitted DR is an objective necessity not only for successful prescription of therapy, but also for minimizing the risk of transmission of DR variants of the virus.

## Conclusion

In our study, the rate of HIV-1 DR to antiretroviral drugs in patients with no history of therapy was 13.8%. However, it was mainly due to resistance to NNRTI class of antiretroviral drugs. These results suggest that the currently recommended antiretroviral drugs of NNRTI, PI and INI classes are likely to be effective, and that viral resistance will have a low negative impact on achievement of the goals of the UNAIDS "95-95-95" strategy in Armenia. The study was carried out on a sample of 982 HIV-infected patients and allowed to assess HIV-1 DR in more than 20% of the country's citizens diagnosed with HIV infection.

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](https://itpc-ecca.org/wp-content/uploads/2019/11/Monitoring-zakupok-preparatov-Armeniya_2018-2019.pdf) (Accessed: 05.08.2022)

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 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>

**Information about the authors**

*Olga A. Osadchaya*<sup>✉</sup> — junior researcher, Laboratory of diagnostics and molecular epidemiology of HIV-infection, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; [osadchaya96@yandex.ru](mailto: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.E.* — 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.

**Информация об авторах**

*Осадчая Ольга Алексеевна*<sup>✉</sup> — м.н.с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, [osadchaya96@yandex.ru](mailto: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>

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

*Мажмудова 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 Карапетович* — 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; *Мажмудова Л.Ф.* — сбор и обработка материала; *Лопатухин А.А.* — статистическая обработка, редактирование; *Кириченко А.А.*, *Лаповок И.А.*, *Шлыкова 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



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

Elena V. Otrasheskaia<sup>1✉</sup>, Konstantin V. Kaa<sup>2</sup>, Alexey S. Oksanich<sup>1</sup>, Nikita V. Murashko<sup>1</sup>, Alexander G. Kusliy<sup>3</sup>, Anatoly G. Krasjko<sup>4</sup>, Vitaly V. Zverev<sup>1</sup>, George M. Ignatyev<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>Vector-Bialgam, Koltsovo, Russia;

<sup>4</sup>Republican 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  $2.89 \pm 0.10 \text{ Ig TCD}_{50}$  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., Kusliy 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>

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

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

Отрашевская Е.В.<sup>1✉</sup>, Каа К.В.<sup>2</sup>, Оксанич А.С.<sup>1</sup>, Мурашко Н.В.<sup>1</sup>,  
Куслий А.Г.<sup>3</sup>, Красько А.Г.<sup>4</sup>, Зверев В.В.<sup>1</sup>, Игнатъев Г.М.<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>«Вектор-Биальгам», Кольцово, Россия;

<sup>4</sup>Республиканский 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- $\gamma$  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  $2,89 \pm 0,10 \text{ Ig TCD}_{50}$  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 РНФ 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., Игнатъев 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>

## Introduction

Research on Chikungunya virus (CHIKV) has received global attention in the recent decades because of its wide geographical distribution, affecting countries in Asia, Oceania, Africa, North, Central and South America. Chikungunya virus infection is a public health problem in endemic regions due to the lack of specific prophylaxis as well as effective antiviral drugs. Between 2004 and 2009, a sudden epidemic of Chikungunya fever affected 31 million people in the Indian peninsula [1, 2]. In 2013, CHIKV from several Caribbean countries spread rapidly to 45 countries in North, Central, and South America [3]. The lethality of Chikungunya fever is low, mainly among newborns and patients with chronic diseases of the cardiovascular, respiratory, and nervous systems [1, 4]. However, lesions of the musculoskeletal system (arthritis and arthralgia) caused by Chikungunya fever often lead to long-term disability. The cause of arthritic joint damage is immune-mediated mechanisms triggered by the pronounced production of pro-inflammatory mediators. CHIKV infection is believed to provide lifelong immunity, and recurrent infections are practically unreported [5, 6]. This factor, along with the lack of specific therapy for both the infection itself and its consequences, makes vaccination the most promising way to prevent Chikungunya fever. It should also be kept in mind that, in addition to the population of Chikungunya endemic countries, there is a population of travelers and professionals visiting or working in endemic countries, but there is also a risk of Chikungunya-endemic regions in developed countries due to climate change and other unforeseen factors that may contribute to the emergence and spread of infection. The fact that the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency have granted Fast Track/Priority Medicine status to several vaccine candidates for the prevention of Chikungunya disease confirms the urgency of the problem and the challenge of bringing effective medical products to market to prevent Chikungunya fever.<sup>1</sup>

In 2023, Valneva's Ixchiq vaccine (VLA1553),<sup>2</sup> developed from an attenuated strain of CHIKV with a deletion of nonstructural protein genes, was registered in the FDA [4]. A number of potential candidate vaccines have been tested on animal models in pre-clinical trials and on humans in clinical trials [4, 7]. At this stage, phase I clinical trials of an inactivated

vaccine<sup>3</sup> developed by Indian scientists have been completed, which has shown sufficient immunogenicity in laboratory animals [8]. However, no inactivated vaccine for the prevention of Chikungunya fever has been registered on the market, which makes its development an objective of high priority. Inactivated vaccine technology is traditional and successful for a large number of viral vaccines. This technological platform is considered to be one of the safest [4, 8–11], and drug development with it does not require genetic manipulation of the virus. In small comparative studies on BALB/c mice, the advantage of a beta-propiolactone inactivated CHIKV antigen preparation over a formalin-inactivated preparation in the formation of specific humoral and cellular immunity was demonstrated [8, 9]. Previously, a dose-dependent effect of humoral and cellular immunity formation in BALB/c mice on the administration of beta-propiolactone inactivated CHIKV antigen was demonstrated [11].

Heteroploid cells of cell line 4647 were used for the preparation of an experimental inactivated vaccine for the prevention of Chikungunya fever at the stage of virus propagation. This cell line was obtained in 1974 from the kidneys of an adult green monkey. The cell bank of cell line 4647, established in 1983, has passed national licensing and at this stage fully meets the recommendations of the World Health Organization. This cell line has been authorized for use in the production of inactivated vaccines [12]. Previously, the possibility of culturing 4647 cells on microcarriers in bioreactors was demonstrated [13]. In our country, the vaccine for hepatitis A prophylaxis *Algavak M*, which uses this cell line (Vector-BiAlgam), is registered and produced. High sensitivity of cell line 4647, along with Vero cell line, to CHIKV has also been shown [14].

The immunogenicity of candidate vaccines against Chikungunya is evaluated by developers not only from the angle of humoral immunity formation, as a gold standard of neutralizing activity of specific post-vaccine antibodies, but also from the angle of cellular immunity formation, which is extremely important for virus clearance in Chikungunya fever [4, 8, 10]. For the experimental study of Chikungunya fever, lower primates are the main models used, since they are natural hosts of CHIKV in nature and the pathogenesis of the disease has a similar pattern to humans. White mice of different lines are used as laboratory animals in the stages of pre-clinical trials. Adult immunodeficient mice, such as AG129 mice, are used to model lethal infection, and immunocompetent mice of the C57Bl/6, Swiss albino or BALB/c lines are used for the non-lethal model. Pre-

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

<sup>2</sup> 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>

<sup>3</sup> 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>



viously, J. Gardner et al. described a non-lethal model of CHIKV infection in which C57Bl/6 mice developed symptoms similar to human joint lesions and developed viremia for 4–5 days. When CHIKV was inoculated into the dorsal side of the foot, C57Bl/6 mice developed perimetatarsal swelling with maximum effect on the 3<sup>rd</sup>–7<sup>th</sup> day, and the development of arthritis, tendonitis, and fasciitis was also noted, as confirmed by histologic evidence of acute and persistent inflammation [15, 16]. This model is often used to evaluate the efficacy of vaccine preparations being developed against CHIKV [17–20]. We also infected mice in the foot to evaluate the efficacy of the inactivated vaccine for the prevention of Chikungunya fever. To evaluate the immunogenicity of the candidate inactivated vaccine, we studied humoral and cellular immunity in C57Bl/6 line mice after double immunization with different doses of the drug, as well as the *in vivo* efficacy of the drug. Since the normal functioning of the immune system is based on the balance of Th1 and Th2 based on their production of regulatory cytokines, we additionally studied the concentration of individual cytokines in the serum of immunized animals in dynamics.

**The aim** of the study was to investigate the formation of protective immunity after administration of a preparation containing CHIKV to C57Bl/6 mice.

### Materials and methods

The strain Nika2021, obtained from the virus collection of the Nicaragua branch of SPbSRIVS of Russian FMBA, was used in the experiments. The technique of isolation and passivation of the CHIKV strain has been described previously [21]. The nucleotide sequence of CHIKV strain Nika2021 is presented in GenBank, acc.no OQ320495.

Cell line 4647 (Vector-Bialgam Production Bank) was cultured in Iglu MEM medium (BioloT) with 5% fetal calf serum (BioloT).

C57Bl/6 mice (haplotype H-2b) of both sexes weighing 12–14 g were used in the study. The animals were obtained from the Stolbovaya cattery of the Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 6, April 4, 2023).

#### Vaccine

Propagation of the *Nika2021* CHIKV strain was carried out in cell line 4647 by roller cultivation using a multiplicity of 0.0001 TCD<sub>50</sub> infection per cell. Inactivation was carried out with beta-propiolactone (at a ratio of 1 : 1000) under constant agitation for 48 h at 5°C. The inactivated virus-containing fluid was concentrated 50-fold by ultrafiltration (Vivaflow 100 concentrator (Sartorius)). The inactivated virus concentrate

was purified by exclusion chromatography (Sephacose-6FF sorbent (GE Healthcare)). Control of the obtained CHIKV preparation was carried out according to the following parameters: sterility, pH, absence of endotoxins, content of residual DNA of 4647 cells according to the methods set forth in the State Pharmacopoeia<sup>4</sup>. The preparation was sterile, endotoxins were absent, residual DNA content of 4647 cells < 5 ng/mL, pH 7.4. The concentration of inactivated CHIKV was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the BioScreen Chikungunya (Ag) kit (Bioservice). The resulting inactivated preparation at concentrations of 10 and 40 µg of antigen was sorbed on aluminum hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>, Brenntag SE). The Al(OH)<sub>3</sub> content of the final drug dose was 0.5 mg per dose (0.5 mL). The doses of 10 and 40 µg were used because previously these doses were used to immunize BALB/c mice (haplotype H-2<sup>d</sup>) and to evaluate the content of specific antibodies in serum in dynamics [14]. In these experiments, the dose of the preparation containing 10 µg of CHIKV antigen, when administered twice, caused an insignificant rise in specific antibodies in the group of animals after the second immunization with a drop by the 35<sup>th</sup> day of observation. In the serum of animals immunized twice with a dose of 40 µg of CHIKV antigen, a rise in specific antibodies was observed 7 days after the first immunization and persisted until day 35 [14].

Due to the available data, the same antigen concentrations were chosen for the current study. Al(OH)<sub>3</sub> at a concentration of 0.5 mg per injection volume (0.5 ml) was used as a control preparation.

### Methods

**ELISA analysis of antibodies (IgG) titer to CHIKV** was performed as previously described [14]. Test serum samples were diluted 1 : 200 and further in step "2" to 1 : 12,800 in phosphate-buffered saline (PBS). Each serum dilution was evaluated in 3 repetitions. A serum dilution that was more than 2 times the background value was considered positive. Serum obtained from mice before immunization was used as a negative control.

**The neutralization test (NT)** was performed as described previously [11] in 96-well plates using Vero cell culture and *Nika2021* strain at a dose of 100 TCD<sub>50</sub>. The result obtained was converted to log<sub>2</sub> for statistical processing.

**The proliferative activity of splenocytes** was studied by photometric method according to the previously described method [14, 25]. The following antigens were used to stimulate the proliferative activity of splenocytes: CHIKV antigen inactivated by beta-propi-

<sup>4</sup> F.S.3.3.1.0029.15. Vaccine for the prevention of hepatitis A, cultured, purified, concentrated, adsorbed, inactivated liquid. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Moscow; 2018. Vol. 4.

olactone (5 µg/mL); hepatitis A virus (HAV) antigen used for the production of Algavac-M vaccine (5 µg/mL), as well as the following mitogens: concanavalin A (ICN; 5 µg/mL) and *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide (Sigma; 5 µg/mL). Each antigen and mitogen was used to stimulate animal splenocytes *in vitro* in 4 repeats. FSB was used as a control.

**Determination of interferon-γ (IFN-γ) production by mouse splenocytes *in vitro*.** Mouse splenocytes were placed in wells of 24-well plates at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/mL. CHIKV and HAV antigens at concentrations of 5 µg/mL were added to the cells to stimulate IFN-γ production. Concanavalin A (ICN; 5 µg/mL) was used as a positive control for stimulation of IFN-γ production, and PBS was used as a negative control. Cells were cultured for 48 h in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. At the end of cultivation, the culture fluid of activated and control cells was collected and the concentration of IFN-γ was determined using a mouse kit (R&D Systems).

**The concentration of cytokines in the mice sera** — interleukins IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, tumor necrosis factor-α (TNF-α), IFN-γ — was determined using mouse kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

To assess the efficacy, the test was performed as described previously [15]. Animals were injected with CHIKV at a dose of  $2.89 \pm 0.10$  lg TCD<sub>50</sub> in a volume of 20 µl into the dorsal surface of the foot of the right hind paw. To control the specificity of the swelling, 20 µL of 0.9% NaCl infusion solution was injected into the foot of the left hind paw. The degree of perimetatarsal edema was assessed on day 6. After measuring the height and width with an electronic caliper at the site of maximum swelling of both feet of the hind paws, the swelling index ( $\text{width} \times \text{height of the infected foot} / \text{width} \times \text{height of the opposite foot}$ ) was calculated. To assess the viremia after infection, the biological activity of CHIKV was determined in the sera of mice by titration of virus in Vero cell line [14]. The result of titration was considered by the expressed cytopathic effect and the tissue cytopathic dose causing 50% cell death (TCD<sub>50</sub>) was calculated by Kerber's method modified by Ashmarin and expressed in log<sub>10</sub> TCD<sub>50</sub>/mL [23].

Statistical analysis of the obtained data was performed using the standard software package Microsoft Office Excel 2016. Data are presented as mean (M) and standard deviation of the mean (SD), where acceptable. The validity of differences between the compared values was assessed using Student's t-test of unpaired, two-tailed distribution (t-test). Differences were considered statistically significant at a significance level of  $p < 0.05$ .

### Study design

The animals were divided into the following groups:

- Group A — 100 mice immunized with the drug at a dose of 40 µg/0.5 ml on the initial and 14<sup>th</sup> days of the experiment;
- Group B — 100 mice immunized with the drug at a dose of 10 µg/0.5 ml on the initial and 14<sup>th</sup> days of the experiment;
- Group C — 100 mice that were intramuscularly injected with Al(OH)<sub>3</sub> on the initial and 14<sup>th</sup> days of the experiment.

The drug was injected into the thigh muscle intramuscularly, dividing 1 dose into 2 injections, 0.25 ml of the drug in each limb.

Animals were observed up to 35 days (21<sup>st</sup> day after the 2<sup>nd</sup> immunization). Five animals from each group on the 0<sup>th</sup> day (before immunization), 14<sup>th</sup> day (before the 2<sup>nd</sup> immunization), 21<sup>st</sup>, 28<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup> days after the start of immunization were used to collect blood samples, which were pooled for further determination of antibody content by two methods. The spleen was isolated from the same animals for further obtaining splenocyte suspension. Splenocytes were used in studies of proliferative activity and IFN-γ production according to the methods described above. In another 5 animals from each group on the initial, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 15, 17, 19, 21, 28 and 35<sup>th</sup> days of observation blood was collected from the retro-orbital sinus of the eye and individual blood samples were collected for further determination of cytokine profile. All serum samples after centrifugation were transferred into tubes in a volume of 200 µl and stored at -70°C for subsequent one-stage study. Also on the 35<sup>th</sup> day, 10 remaining mice from each group were used to evaluate the efficacy of the candidate drug in the non-lethal model described previously [15].

All procedures on individual mice were performed outside visual, auditory or olfactory contact with other animals. Work with animals was carried out in accordance with the International Principles of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments and Other Scientific Purposes" ETS No. 123 (Strasbourg, 1986) and Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission from 03.11.2016 No. 81 "On Approval of the Rules of Good Laboratory Practice of the Eurasian Economic Union in the field of circulation of medicines".

## Results

### Humoral immunity

The dose of the preparation containing 10 µg of CHIKV antigen caused an insignificant and short-term rise in specific antibodies in ELISA after the 2<sup>nd</sup> immunization of animals of group B (Table 1). In this group of animals, the maximum level of specific antibodies was 4 times lower than in the group of animals of group A. Administration of the preparation containing 40 µg of CHIKV antigen to animals of group A resulted in the formation of a sufficiently high level of specific anti-

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

Group	NT, log <sub>2</sub>	ELISA IgG, titer	NT, log <sub>2</sub>	ELISA IgG, titer	NT, log <sub>2</sub>	ELISA IgG, titer	NT, log <sub>2</sub>	ELISA IgG, titer	NT, log <sub>2</sub>	ELISA IgG, titer
	0 day (1 <sup>st</sup> immunization)		14 <sup>th</sup> day (2 <sup>nd</sup> immunization)		21 <sup>st</sup> day		28 <sup>th</sup> day		35 <sup>th</sup> day	
A	H. o. N. d.	H. o. N. d.	4,80 ± 0,14*	1 : 1600**	5,45 ± 0,15*	1 : 3200**	6,84 ± 0,18*	1 : 6400**	6,80 ± 0,38*	1 : 6400**
B	H. o. N. d.	H. o. N. d.	2,16 ± 0,18	1 : 200	2,20 ± 0,18	1 : 400	3,12 ± 0,10	1 : 400	2,20 ± 0,10	1 : 200
C	H. o. N. d.	H. o. N. d.	0	0	0	0	0	0	0	0

**Note.** \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  in comparison with group B. N. d. — not detected. Animals were bled on days 0 and 14 for the specific immunity testing before antigen administration.

bodies on the 14<sup>th</sup> day after the 1<sup>st</sup> immunization, which increased 4-fold after the 2<sup>nd</sup> vaccination by the end of the observation period (Table 1).

In both groups, viral neutralizing antibodies were registered on day 14 after the 1<sup>st</sup> immunization and reached maximum values after the 2<sup>nd</sup> immunization (Table 1). In animals of group B, virus-neutralizing antibodies were significantly lower ( $p < 0.01$ ) than in group A. In the serum of animals of group C, no antibodies were detected in any of the methods.

#### Cellular immunity

The effect of immunization with an inactivated preparation of CHIKV antigen on the formation of a specific cellular response was evaluated in the splenocyte proliferation reaction and IFN- $\gamma$  production after antigen stimulation. The used viral antigens (specific CHIKV and heterologous HAV) did not inhibit splenocyte proliferation *in vitro* on day "0" (Fig. 1).

In response to stimulation with mitogens (concanavalin A and lipopolysaccharide), splenocytes from animals of all groups showed pronounced proliferation, which was significantly higher than that with viral antigens at all periods of observation ( $p < 0.05$ ). The index of stimulation (IS) of splenocytes of animals in group A was statistically higher, starting from the 7<sup>th</sup> day after the 2<sup>nd</sup> immunization and up to the end of observation, ( $p < 0.005$  on the 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> days;  $p < 0.05$  on the 35<sup>th</sup> day) relative to the similar indicators in animals in group B. The statistically significant difference between the IS of splenocytes by CHIKV antigen in animals of groups A and B at all observation periods after the 2<sup>nd</sup> immunization indicates not only the specificity of the proliferative response of splenocytes in immune animals, but also a dose-dependent effect. Splenocytes of non-immune animals of group C responded with a pronounced proliferation to stimulation with only T- and B-cell mitogens (concanavalin A and lipopolysaccharide), while IS did not change upon stimulation with viral antigens at all observation periods (Fig. 1).

The increase in IFN- $\gamma$  production by splenocytes of animals during their stimulation with specific antigen (Table 2) indicates the formation of a specific cellular immune response in immunized animals.

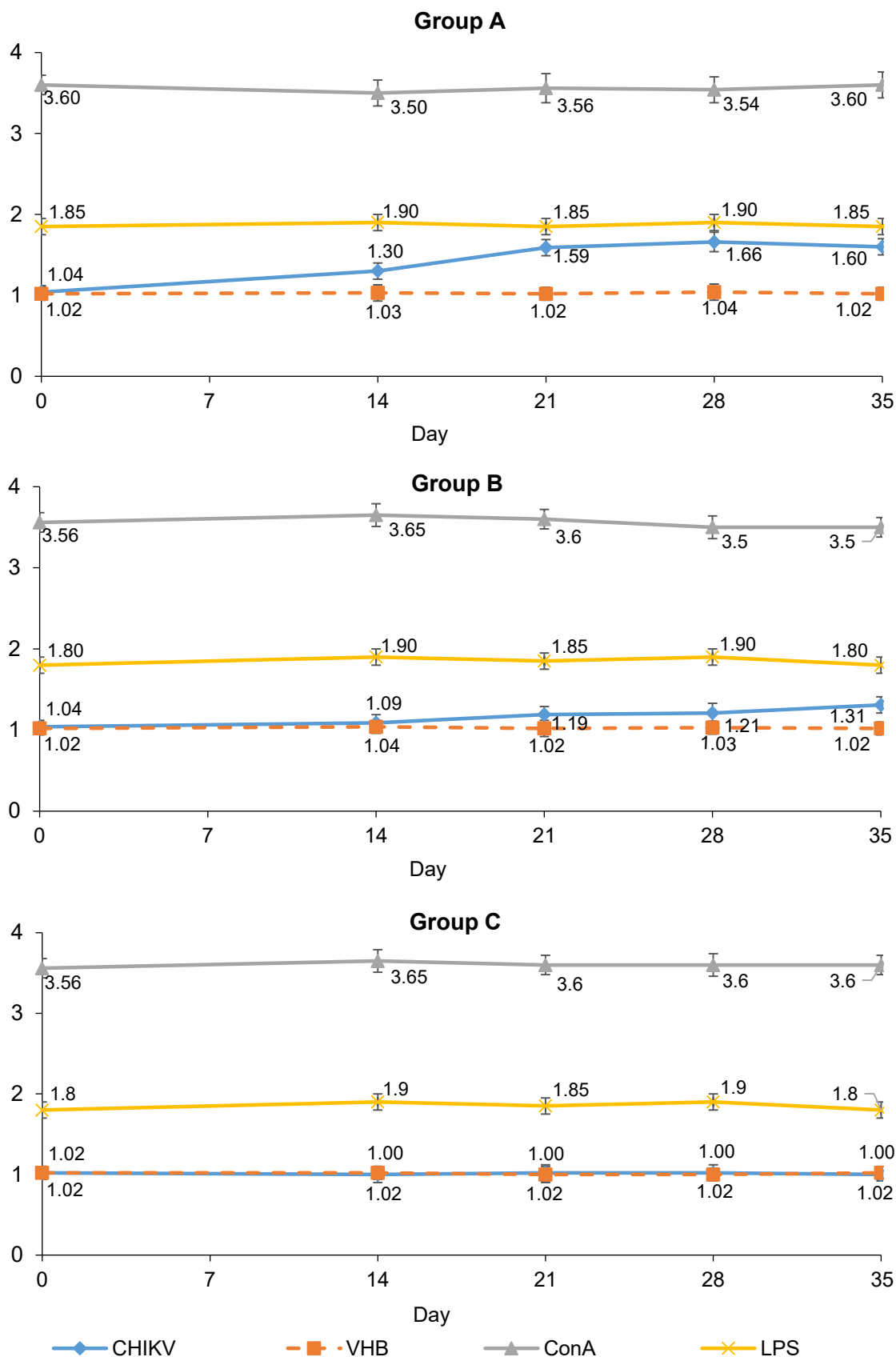
IFN- $\gamma$  production by group A animal splenocytes was significantly higher than in group B at all observation periods ( $p < 0.05$ – $0.005$ ). In animals of group A, the increased production of IFN- $\gamma$  by splenocytes persisted up to 35 days of observation. The dose-dependent effect of IFN- $\gamma$  production by splenocytes of immune animals was demonstrated.

#### Cytokine concentrations in the serum of mice

Administration of Al(OH)<sub>3</sub> did not lead to a significant increase in the concentration of any of the studied cytokines in the serum of mice. On the contrary, administration of inactivated CHIKV antigen led to an increase in the concentration of the cytokines studied both after the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> immunization with maximum elevations after the 1<sup>st</sup> immunization. The exception was the production of IFN- $\gamma$ . By the 35<sup>th</sup> day after the 1<sup>st</sup> immunization, the production of all cytokines studied returned to the initial values (Fig. 2–4).

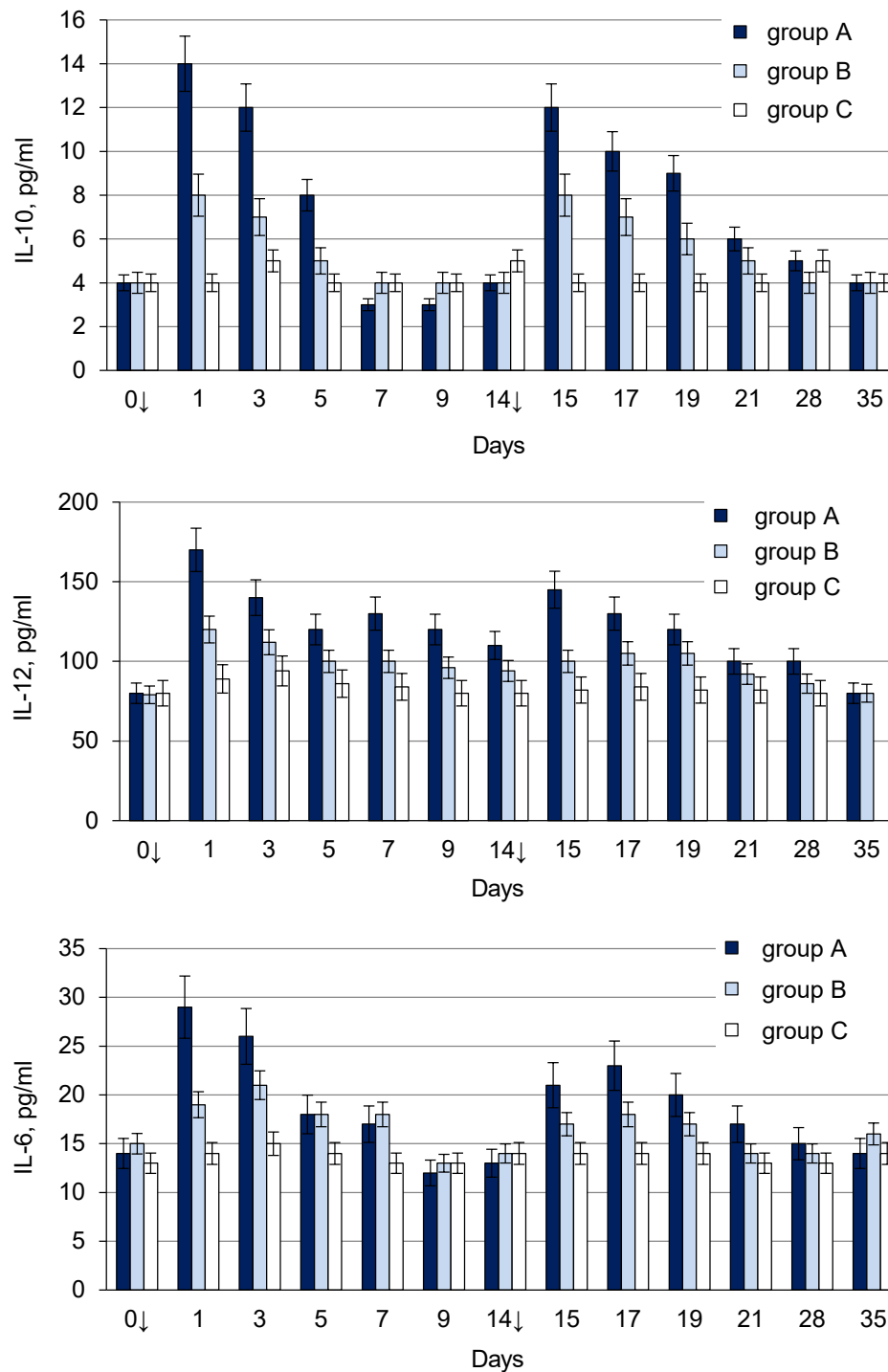
The maximum rise in the concentration of IL-6, IL-10 and IL-12 in the blood serum of mice was observed on the 1<sup>st</sup> day after the 1<sup>st</sup> immunization (Fig. 2). IL-10 concentration increased almost 4-fold relative to the initial level ( $p < 0.0001$ ), i.e. to a greater extent than IL-6 and IL-12 concentrations, which increased almost 2-fold ( $p < 0.001$ ). The concentration of IL-10, IL-12 and IL-6 in group A animals vaccinated with 40  $\mu$ g dose was significantly higher than in group B animals vaccinated with 10  $\mu$ g dose both after the 1<sup>st</sup> and after the 2<sup>nd</sup> immunization ( $p < 0.001$  for IL-10, IL-12 and  $p < 0.005$  for IL-6).

The maximum rise in the concentration of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the serum of mice was detected on the 3<sup>rd</sup> day after the 1<sup>st</sup> immunization;  $p < 0.001$  relative to the initial level (Fig. 3). At the same time, the concentration of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in animals of group A, immunized



**Fig. 1.** Proliferative activity of splenocytes from C57Bl/6 mice immunized with the preparation contained different CHIKV antigen dose in dynamics.

ConA — Conkanavalin A; LPS — lipopolysaccharide.



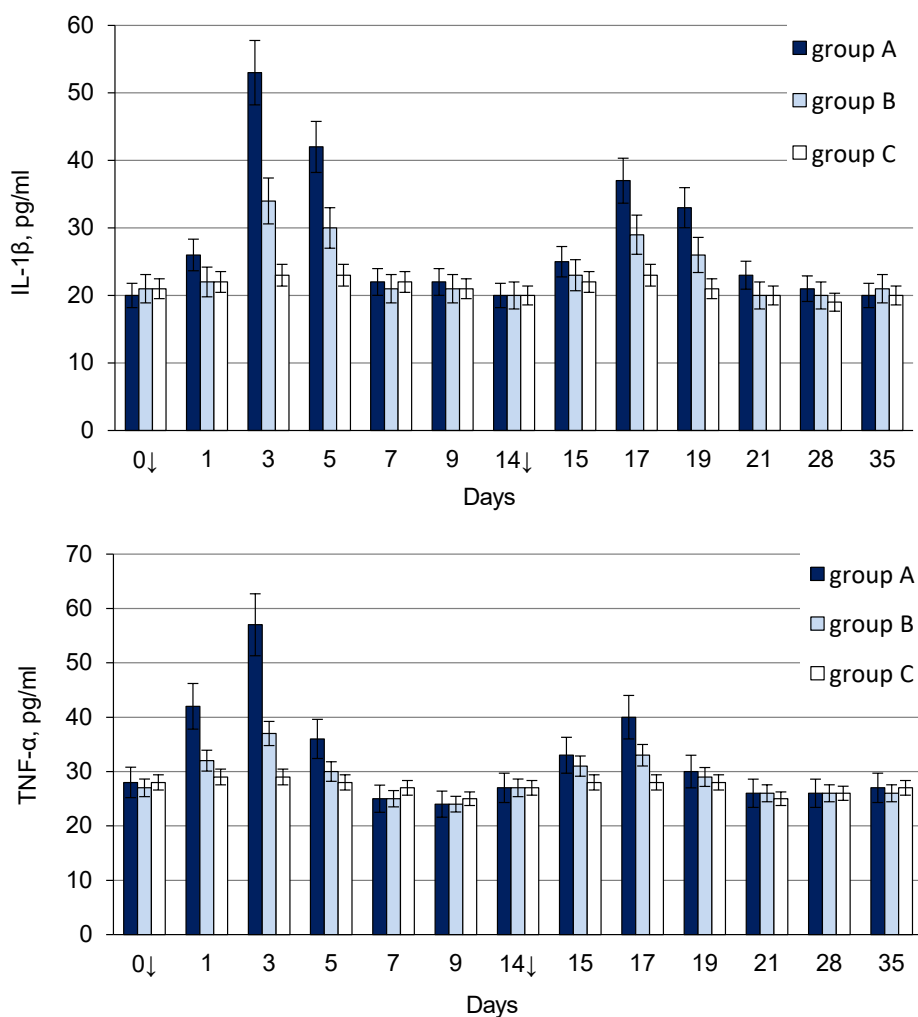
**Fig. 2.** Dynamic of cytokines IL-6, IL-10, IL-12 in C57Bl/6 mice' sera immunized with the different doses of inactivated CHIKV. Here and on Figs. 3, 4: arrow — day of immunization; animals were bled on days 0 and 14 for the specific immunity testing before antigen administration.

with a dose of 40  $\mu\text{g}$ , was significantly higher than in animals of group B, immunized with a dose of 10  $\mu\text{g}$  after the 1<sup>st</sup> ( $p < 0.001$ ) and 2<sup>nd</sup> immunization ( $p < 0.005$ ).

The maximum rise in IL-2 and IL-4 concentration was observed on the 7<sup>th</sup> day after the 1<sup>st</sup> immunization (Fig. 4). In group A IL-4 showed almost 4-fold increase ( $p < 0.0001$ ). IL-4 and IL-2 concentrations in group

A animals immunized with a 40  $\mu\text{g}$  dose were significantly higher than those in group B animals immunized with a 10  $\mu\text{g}$  dose, both after the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> immunizations ( $p < 0.001$ ).

The dynamics of IFN- $\gamma$  in both groups of immunized animals was different from all other cytokines. A very moderate rise in IFN- $\gamma$  level ( $p < 0.05$ ) after the



**Fig. 3.** Dynamic of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in C57Bl/6 mice' sera immunized with the different doses of inactivated CHIKV.

1<sup>st</sup> immunization on days 3–7 and a pronounced rise (5-fold) after the 2<sup>nd</sup> immunization ( $p < 0.0001$ ) were observed in group A. In group B, there was practically no rise in IFN- $\gamma$  after the 1<sup>st</sup> immunization, but after the 2<sup>nd</sup> immunization the rise was statistically significant ( $p < 0.01$ ). The maximum concentration of IFN- $\gamma$  in group A animals vaccinated with 40  $\mu$ g dose was significantly higher than in group B animals vaccinated with 10  $\mu$ g dose after the 2<sup>nd</sup> immunization ( $p < 0.0001$ ). The dynamics of IFN- $\gamma$  production in animal splenocytes, described above, also demonstrated a more significant rise in IFN- $\gamma$  levels after the 2<sup>nd</sup> immunization of animals in both groups.

The results of evaluating the efficacy of the candidate vaccine are presented in **Table 3**. It should be noted that injection of 0.9% NaCl solution into the foot of the animal was not accompanied by an increase in edema. The foot measurements were used to calculate the edema index, which differed statistically significantly between vaccinated and unvaccinated animals; group A animals had a statistically lower edema index relative to that of group B animals.

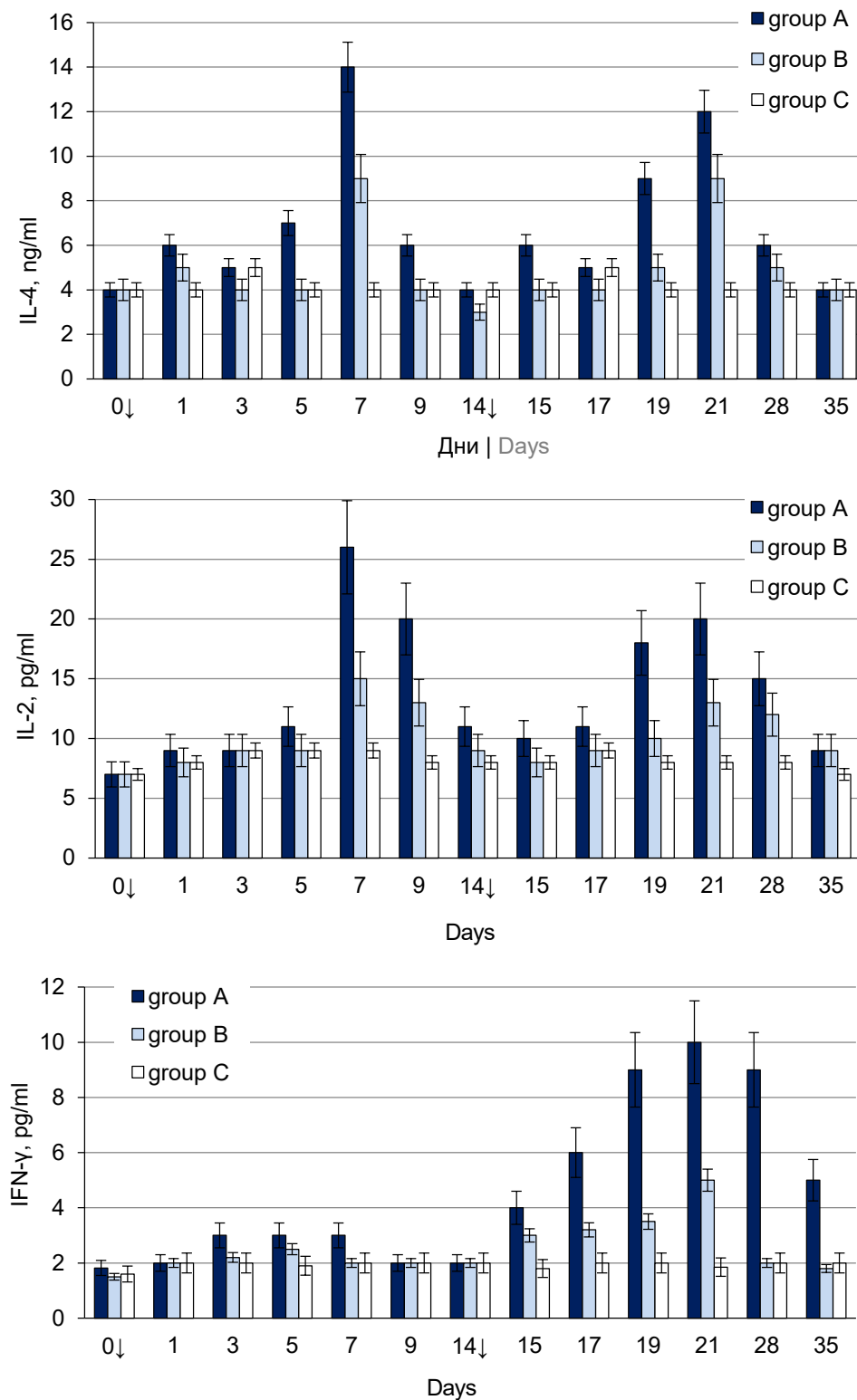
Viremia was observed at both observation points only in the group of non-immunized animals of group C. In contrast, no viremia was detected in group A animals immunized with the maximum dose of CHIKV antigen.

## Discussion

Lifelong immunity and the virtual absence of re-infection, cross-protection between different strains of CHIKV [2, 4–6] and the lack of specific therapy for infection make vaccination the most promising way to prevent Chikungunya fever.

Recognizing the urgent need for an effective vaccine and the lack of its availability on the market, the World Health Organization supports countries in surveillance and control of arboviruses, including CHIKV<sup>5</sup>. Various strategies and technological platforms have been used to develop an effective vaccine [4, 7]. It should be noted that the safety of inactivated vaccines

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



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

is achievable solely due to the cost of organizing production, compliance with the necessary biosafety conditions, and constant monitoring of the completeness of virus inactivation. Nevertheless, the advantages of inactivated vaccines, such as the absence of the risk of

virulence reversion of the vaccine strain, as well as the stability of the preparation itself, which makes storage and transportation much easier and cheaper, explain the widespread use of this technology platform for vaccine development. In the present study, we demonstrated

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

Group	Antigen	INF- $\gamma$ concentration, pg/ml				
		0 day (1 <sup>st</sup> immunization)	14 <sup>th</sup> day (2 <sup>nd</sup> immunization)	21 <sup>st</sup> day	28 <sup>th</sup> day	35 <sup>th</sup> day
A	CHIKV	5,0 $\pm$ 0,4	12,8 $\pm$ 1,3 <sup>***</sup>	49,0 $\pm$ 4,2 <sup>***</sup>	57,0 $\pm$ 5,7 <sup>***</sup>	47,0 $\pm$ 2,7 <sup>***</sup>
	VHB	5,4 $\pm$ 0,9	4,8 $\pm$ 0,8	5,4 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 0,7	5,8 $\pm$ 0,4
	Concanavalin A	1066,0 $\pm$ 84,0	1110,0 $\pm$ 22,4	1269,0 $\pm$ 74,7	1093,0 $\pm$ 55,5	1125,0 $\pm$ 125,0
	PBS	5,8 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,9	5,4 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 0,5
B	CHIKV	4,4 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,8	19,6 $\pm$ 3,6 <sup>**</sup>	16,0 $\pm$ 1,6 <sup>**</sup>	13,6 $\pm$ 2,7 <sup>**</sup>
	VHB	5,0 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,9
	Concanavalin A	1133,0 $\pm$ 90,9	1108,0 $\pm$ 36,8	1249,0 $\pm$ 57,3	1229,0 $\pm$ 27,0	1089,0 $\pm$ 73,7
	PBS	5,9 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 0,5
C	CHIKV	5,0 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,9	4,8 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,8
	VHB	5,0 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,9	4,8 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,9
	Concanavalin A	1153,0 $\pm$ 29,5	1145,0 $\pm$ 94,2	1249,0 $\pm$ 35,8	1128,0 $\pm$ 56,6	1113,0 $\pm$ 46,6
	PBS	5,0 $\pm$ 0,7	5,8 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 0,7	5,8 $\pm$ 0,4

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

the immunogenic properties of a beta-propiolactone inactivated preparation for the prevention of Chikungunya fever after double administration into C57Bl/6 mice. The immunogenicity of the candidate drug was confirmed by the formation of specific humoral and cellular immunity in laboratory animals, as well as by a balanced response of T-helper clones. The results obtained in this study are comparable to those previously described in a study by M. Tiwari et al. [8]. The maximum increase in specific antibodies in ELISA and NT reactions, as well as in splenocyte IS *in vitro*, was observed in animals inoculated with both doses of the preparation after double immunization. However, high titers of specific antibodies and IS of splenocytes were maintained until the end of the observation period only in the group of animals immunized with the preparation containing 40  $\mu$ g of CHIKV antigen. The dose-dependent effect of the preparation was observed both when analyzing the titers of specific antibodies and IS of splenocytes *in vitro* and when analyzing the concentrations of cytokines in the serum of mice. The production of all

cytokines studied both in the serum of mice and during *in vitro* stimulation of animal splenocytes was maximal in the group of animals inoculated with the preparation containing 40  $\mu$ g of CHIKV antigen. Studies of cytokine production after administration of the inactivated vaccine for the prevention of Chikungunya fever are not available in open scientific sources, to the best of our knowledge. However, it is extremely important to make sure that the formed post-vaccine immunity will be sufficiently balanced between T-helper clones, since the normal functioning of the immune system is based on the balance of Th1 and Th2, based on their production of regulatory cytokines. Unbalanced activation of T-helper clones can lead to the development of immunopathological conditions, which in the case of a preparation containing CHIKV antigen is of particular importance.

Of the proinflammatory cytokines, IL-6 was the first to respond to vaccine administration. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  showed a moderate rise on the 3<sup>rd</sup> day, and the maximum rise of IL-2 was registered on the 7<sup>th</sup> day af-

**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 lg TCID<sub>50</sub>/ml into the dorsal part of foot

Group	Swelling index	CHIKV titer, lg TCID <sub>50</sub> /ml	
	6 <sup>th</sup> day	3 <sup>th</sup> day	6 <sup>th</sup> day
A	1,2 $\pm$ 0,21 <sup>**</sup>	H.o.   N.d.	H.o.   N.d.
B	2,1 $\pm$ 0,24	1,4 $\pm$ 0,13 <sup>#</sup>	H.o.   N.d.
C	3,04 $\pm$ 0,21 <sup>+</sup>	4,3 $\pm$ 0,18	1,8 $\pm$ 0,18

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



ter the drug administration. The release of pro-inflammatory cytokines was balanced by a significant rise in anti-inflammatory IL-10 and IL-4. IL-10 is known to play a role not only in controlling inflammatory reactions and limiting immune overreaction, and its appearance in the first days also indicates stimulation of CHIKV-specific antibody production [24, 25]. There have been interesting studies on the role of IL-10 on the administration of Al(OH)<sub>3</sub> to IL-10-deficient mice. Experimentally, we found that the absence of IL-10 signaling did not compromise Al(OH)<sub>3</sub>-induced cellular infiltration at the injection site, but did result in an enhanced antigen-specific Th1 response after injection. Al(OH)<sub>3</sub> enhanced IL-10 transcription and secretion by macrophages and dendritic cells. Collectively, these results indicated that Al(OH)<sub>3</sub> injection promotes the production of IL-10, which can block Th1-immune response [25]. IL-4 also serves as a marker of Th2 lymphocyte subpopulation activation. In our study, along with IL-10, there was a significant increase in IL-4 on the 7<sup>th</sup> day after vaccination. The sufficiently pronounced Th-2-cell immune response in our experiment can be explained not only by the efficacy of the inactivated CHIKV antigen itself, but also by the presence of the adjuvant Al(OH)<sub>3</sub> in the preparation. Until recently, it was known that Al(OH)<sub>3</sub>-based adjuvants preferentially stimulate the Th2-cell immune response. It has been repeatedly demonstrated that aluminum salts induce Th2-cell response specifically in mice [8, 25]. Aluminum salts have been the most widely used adjuvants for almost a century. Aluminum was originally thought to provide a depot effect by which antigen is slowly released from the surface of microparticles at the site of administration, allowing antigen-presenting cells to gradually utilize the antigen. In recent years, it has been shown that the mechanism of action of aluminum salts as an adjuvant in humans is not as unambiguous and is much more complex than originally thought. Factors that strongly influence the immune response induced by the application of Al(OH)<sub>3</sub> include adsorption rate, adsorption strength, size and homogeneity of Al(OH)<sub>3</sub> particles, adjuvant dosage, and the nature of the antigens used [26, 27]. The current understanding of the mechanism of action of Al(OH)<sub>3</sub>-based adjuvants includes, in addition to the repository effect, a phagocytic effect and activation of the proinflammatory pathway NLRP3. All this together stimulates both innate and adaptive immunity, as well as activates the complement system [26]. The secretion of IL-1β and IL-6 *in vitro* was demonstrated to increase significantly under the action of Al(OH)<sub>3</sub> in human monocytes [28]. Aluminum salts induce uric acid production *in vivo*, which is a necessary factor for the infiltration of inflammatory cells [29]. In turn, elevated uric acid levels lead to NLRP3 activation of the inflammasome and thus IL-1β secretion [29]. Moreover, two new immunologically relevant cellular pathways of monocyte

stimulation by Al(OH)<sub>3</sub> have been identified: the first is type I IFN secretion, potentially induced by TLR and/or NOD-like signaling; the second is IFN-γ-induced presentation of HLA class I and II antigens [30]. The functional state of the Th1-subpopulation is usually judged by the production of IFN-γ by immunocompetent cells. The formation of specific cellular immunity in mice after double injection of inactivated CHIKV antigen at a dose of 40 μg in our study is confirmed by the *in vitro* splenocyte IS data, which corresponds to the published data [8, 11]. A 5-fold increase in the concentration of IFN-γ in the blood serum of mice after the 2<sup>nd</sup> immunization also testifies to the stimulation of specific cellular immunity. The powerful release of IL-10 on the 1<sup>st</sup> day after the drug administration to mice was followed by an increase in the production of not only IFN-γ, but also TNF-α and IL-2, which are also mediators of Th1-cell response. It can be argued that in our experiment the route of administration and the ratio of the dose of antigen and Al(OH)<sub>3</sub> and, more likely, the combination of CHIKV antigen and Al(OH)<sub>3</sub>, led to a balanced response of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as stimulation of both humoral and cellular immunity.

To study the efficacy of the inactivated vaccine, we used a non-lethal model of CHIKV infection in C57Bl/6 mice, which had not been previously used by domestic developers of similar preparations. This model demonstrated the specificity of paw edema and transient viremia in non-immune animals. In immunized animals, paw edema was statistically less significant, and viremia was recorded once only in the group of animals immunized with the minimum dose. This non-lethal model of CHIKV infection in mice allowed us to confirm the efficacy of the developed candidate vaccine against CHIKV, which is explained, among other things, by the balance between T-helper, Th1 and Th2 clones, which was confirmed by the concentration of regulatory cytokines in the serum of immunized animals.

The results of the presented study of immunogenicity of the preparation containing inactivated CHIKV, as well as the results of the study of efficacy of this preparation allow us to evaluate it as promising for further studies. The drug dose of 40 μg/0.5 ml and the scheme of twice-daily immunization can also be assessed as adequate. Our chosen technological platform allows us to produce the vaccine for Chikungunya fever prophylaxis on cell line 4647 rather quickly.

## Conclusion

Two-fold administration of CHIKV virus (inactivated by beta-propiolactone and purified, 40 μg/0.5 ml) into C57Bl/6 mice provided the development of specific Th1/Th2-immune response – humoral (antibodies with viral neutralizing effect), cellular (expressed proliferation of splenocytes *in vitro* and IFN-γ production), as well as balanced production of pro-

and anti-inflammatory cytokines. Efficacy studies in a non-lethal animal model confirmed the efficacy of the inactivated vaccine. The results obtained allow us to evaluate the vaccine as promising for the prevention of Chikungunya fever.

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. Otrasheskaya 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 иммунобиологии.* 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/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4> EDN: <https://elibrary.ru/ufhtab>
- 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 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/vkxbyi>
- 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. Kaa K.V., 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 иммунобиологии.* 2020;97(3):227–32. Ignatyev G.M., Kaa K.V., Oksanich A.S., et al. Indication and identification of Dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2020;97(3):227–32. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4> EDN: <https://elibrary.ru/ufhtab>
- 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.jprot.2017.12.021>

### Information about the authors

*Elena V. Otrashvskaja*<sup>✉</sup> — leading researcher, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, [e.v.otrashevskaja@mail.ru](mailto: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:** *Otrashvskaja 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

### Информация об авторах

*Отрашевская Елена Викторовна*<sup>✉</sup> — в.н.с. лаб. молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия, [e.v.otrashevskaja@mail.ru](mailto: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>

*Оксанч 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 E.V.* — разработка дизайна исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов исследований, статистическая обработка, написание статьи; *Каа K.V.* — обсуждение дизайна исследования, обобщение результатов исследования, написание статьи; *Оксанч A.C.* — проведение исследований, анализ результатов; *Мурашко N.V.* — проведение исследований, обобщение результатов исследования; *Куслий A.G.* — обсуждение дизайна исследования, подготовка культур клеток, обсуждение результатов и текста статьи; *Красько A.G.* — обсуждение дизайна исследования, проведение исследований, обсуждение результатов; *Зверев V.V.* — обсуждение концепции исследования, обобщение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи; *Игнатъев G.M.* — 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

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



## Влияние *Bacillus subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2*<sup>-/-</sup>

Морозова М.В.<sup>1✉</sup>, Коркина В.И.<sup>2</sup>, Макарова М.А.<sup>3</sup>, Литвинова Е.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий, пос. Краснообск, Россия;

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

<sup>4</sup>Новосибирский 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*<sup>-/-</sup>.

**Материалы и методы.** Самкам мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> на протяжении 2 мес добавляли в корм споры *B. subtilis* BS20 в количестве 10<sup>9</sup> 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*<sup>-/-</sup>. 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*<sup>-/-</sup>, 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*<sup>-/-</sup>, *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*<sup>-/-</sup>. *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*<sup>-/-</sup>

Maryana V. Morozova<sup>1✉</sup>, Valentina I. Korkina<sup>2</sup>, Mariia A. Makarova<sup>3</sup>, Ekaterina A. Litvinova<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies, Krasnoobsk, Russia;

<sup>3</sup>Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

<sup>4</sup>Novosibirsk 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*<sup>-/-</sup>.

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

**Materials and methods.** *Muc2*<sup>-/-</sup> females were fed spores of *Bacillus subtilis* BS20 in the amount of 10<sup>9</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup>, *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*<sup>-/-</sup>. *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<sup>-/-</sup>* 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<sup>-/-</sup>* — 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 *Muc<sup>+/-</sup>* 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<sup>-/-</sup>*. Для достижения цели были поставлены задачи: определить эффект добавления в корм мышам *Muc2<sup>-/-</sup>* 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<sup>-/-</sup>* 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 10<sup>9</sup> 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<sup>-/-</sup>* 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 спорную форму. Споры бактерий ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и добавляли в корм в количестве 10<sup>9</sup> 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<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-лимфоциты. Для анализа вычисляли процент CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-Т-клеток, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Т-хелперов, CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-киллеров, CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>-В-клеток, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-регуляторных Т-клеток и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-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.

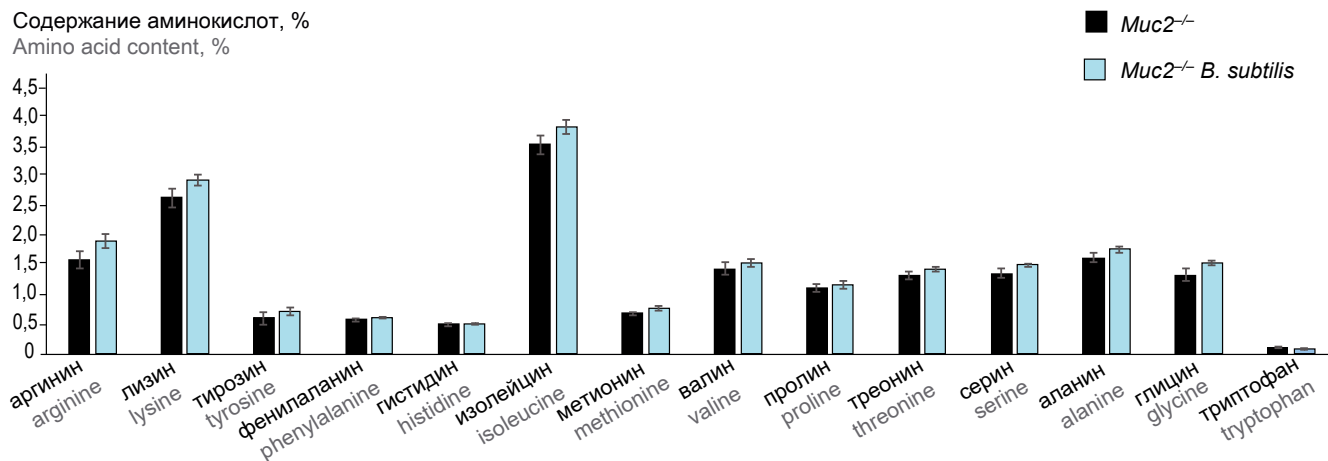
#### Результаты

Для определения жизнеспособности спор *B. subtilis* BS20 при прохождении через пищеварительный тракт исследовали количество жизнеспособных спор в содержимом кишечника самок *Muc2*<sup>-/-</sup> и в корме через 1 мес от начала добавления в рацион животных. Количество жизнеспособных спор *B. subtilis* BS20 во всех образцах помета мышей составило 10<sup>7</sup> КОЕ/г, в корме — в 10<sup>9</sup> КОЕ/г.

Хроническое воспаление кишечника у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> 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.



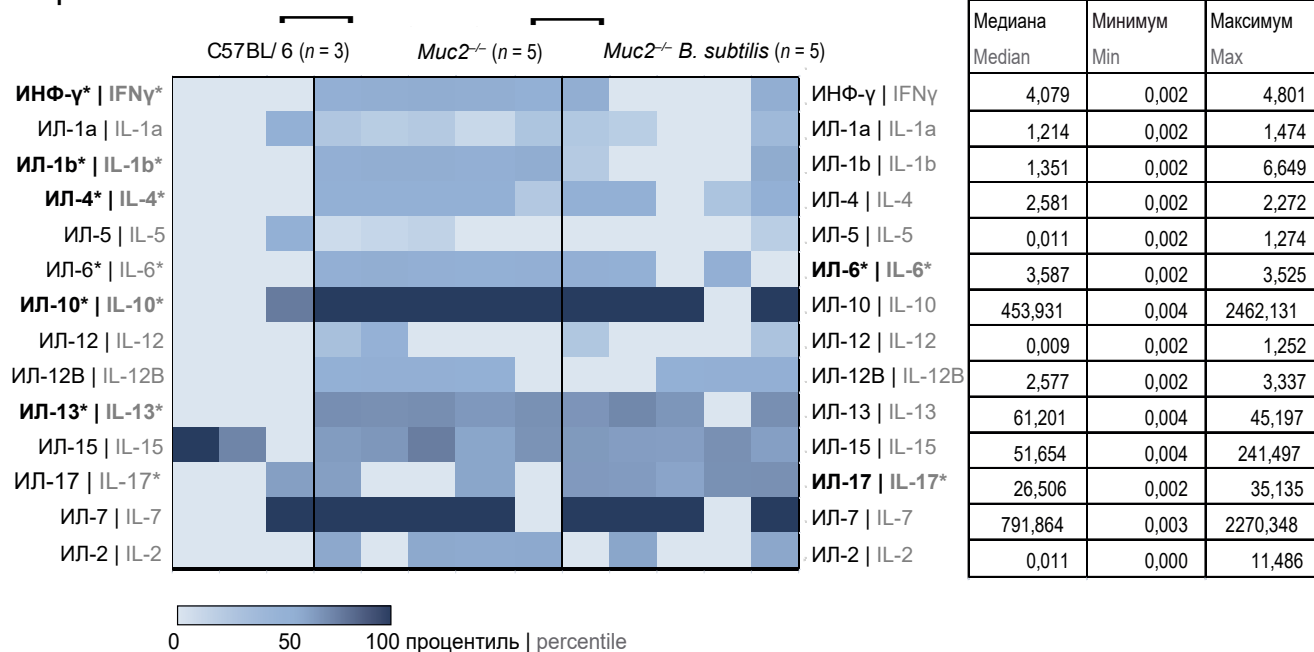
Содержание аминокислот, %  
Amino acid content, %



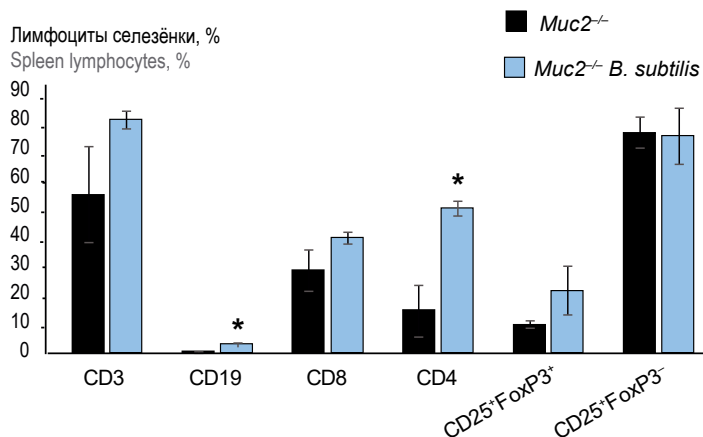
**Рис. 1.** Влияние добавления в корм спор *B. subtilis* BS20 на состав аминокислот в мышечной ткани бедра мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* ( $n = 5$ ) и *Muc2<sup>-/-</sup> B. subtilis* ( $n = 6$ ).

**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<sup>-/-</sup>* mice ( $n = 5$ ) and *Muc2<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup>* 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<sup>-/-</sup>* 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 значительно 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*<sup>-/-</sup>, содержащихся на обычном корме, в нисходящей ободочной кишке наблюдалось развитие воспаления и изменения профиля и уровней цитокинов интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), 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*<sup>-/-</sup>, получавшей с кормом споры *B. subtilis* BS20, отмечено снижение уровня ИЛ-6 и повышение значений ИЛ-17 по сравнению с мышами *Muc2*<sup>-/-</sup>, находящимися на корме без добавок ( $p < 0,05$ ). Уровни ИФН- $\gamma$ , 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*<sup>-/-</sup> отмечено достоверно значимое увеличение доли В-клеток (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) и Т-хелперов (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>);  $p < 0,05$  (рис. 2, б). Статистически значимых различий в количестве других лимфоцитов: Т-клетки (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>), Т-киллеры (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), регуляторные (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) и эффекторные (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>) 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*<sup>-/-</sup>, 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*<sup>-/-</sup> 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- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), ИЛ-1b и -6. В.Д. Бец и соавт. [15] показали, что в сравнении с мышами C57BL/6 у линии *Muc2*<sup>-/-</sup> увеличена экспрессия цитокинов ИФН- $\gamma$ , 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*<sup>-/-</sup> 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- $\alpha$  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- $\alpha$ , 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup>, 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*<sup>-/-</sup> при кормлении неавтоклавированным 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 автоклавированный 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*<sup>-/-</sup>, 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*<sup>-/-</sup> 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- $\gamma$  to IL-10 and TNF- $\alpha$  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<sup>+/+</sup> 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 Schmiedeberg's 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<sup>-/-</sup> and Muc2<sup>+/-</sup> 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*<sup>✉</sup> — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных моделей нейropsихиатрических нарушений НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия, [morozova.maryana@mail.ru](mailto: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*<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental models of neuropsychiatric disorders, Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia, [morozova.maryana@mail.ru](mailto: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



# 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<sup>✉</sup>, 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>

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

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

Шалепо К.В.<sup>✉</sup>, 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 (СГВ; *Streptococcus 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>

## Introduction

Group B streptococci (GBS), of which *Streptococcus agalactiae* is the only representative, are short-chain Gram-positive cocci, facultative anaerobes with  $\beta$ -hemolytic activity. They are usually commensal organisms and colonize the gastrointestinal tract and lower reproductive tract in about 20-30% of women [1]. In Russia, this figure reaches 16.3% [2].

When colonized with GBS, symptoms are usually absent. However, GBS in adults can provoke pyelonephritis, arthritis, development of abscesses, mastitis, endocarditis, septicemia, and others. *S. agalactiae* are a common cause of inflammatory diseases of the urogenital tract of women and the main etiologic agent of early neonatal period infections. They are most relevant in the etiology of perinatal infections, as they can cause genitourinary tract infections, preterm labor, stillbirth, chorioamnionitis, postpartum sepsis and a number of unfavorable outcomes for the mother and child, such as neonatal sepsis, meningitis or pneumonia. Fetal infection most often occurs intrauterine, when GBS ascend from the vagina into the amniotic fluid, but infection may occur during the fetus' passage through the mother's birth canal (intrapartum).

Neonatal infections caused by GBS are clinically subdivided into early infections, which develop before the 6th day of life, and late infections, which develop 7-89 days after birth [3].

The complex pathogenesis of the disease in the mother and child associated with *S. agalactiae* is associated with a large arsenal of virulence factors of this microorganism, which can vary widely from an asymptomatic carrier to the development of an invasive infection.

More than 20 different virulence factors of the microorganism contribute to the pathogenesis of GBS infection. These include adhesins, enzymes, and other proteins that can vary widely depending on the strain of the microbe. Cell adhesion molecules play an important role in the attachment of the microorganism to the host cell. Specific adhesins mediate colonization of *S. agalactiae* to various receptors present on the surface of the mucosal epithelium, ensuring its transmission to newborns during their passage through the maternal birth canal. These proteins are essential for the microorganism at the initial stage of colonization and promote invasion into the host epithelial and endothelial cells, as well as participate in the formation of biofilms. Pili are an important factor of virulence and pathogenicity of GBS and are long filamentous protein structures consisting of covalently bound protein subunits attached to the cell wall, protruding beyond the capsule that covers the bacterial surface [4].

Many GBS virulence factors influence the ability of each strain to colonize a particular biotope or cause severe disease. One of the key virulence factors is the GBS capsular polysaccharide (CPS), first identified by

Dr. Rebecca Lunsfield in the 1930s. To date, 10 unique CPS serotypes (Ia, Ib, II-IX) are known [1, 5], with 6 of them (Ia, Ib, II-V) accounting for 98% worldwide [1].

There are several approaches to determine the serotypes of *S. agalactiae*. The Lancefield precipitation test (latex-agglutination method) is considered the standard method for the determination of GBS serotypes. Molecular biological methods based on DNA analysis include real-time PCR-based GBS genotyping, multiplex PCR analysis for direct identification of *S. agalactiae* capsule type (Ia to IX), and full-genome sequencing. Serotyping of GBS isolates is important for understanding local epidemiology and monitoring CPS genotype change.

In addition to serotype distinction, GBS can also be clustered genetically by multi-locus sequence typing. This is accomplished by sequencing 7 housekeeping genes for any strain of GBS, and the combination of these 7 genomic loci creates a sequence type (ST) [6]. Among a global and ecologically diverse sample of strains, 4 major sequence types were found: ST-1, ST-17, ST19, and ST23 [6]. Of these, ST-1 and ST-19 were mainly associated with asymptomatic carriers of GBS, ST-23 was common among both asymptomatic carriers and cases of invasive disease, and ST-17 serotype III strains were associated with neonatal invasive infections [6].

There are several approaches to antenatal screening for GBS worldwide. First, it is universal screening for *S. agalactiae* late in pregnancy (35-37 weeks) using a culture-based diagnostic method. Another approach is based on the presence of obstetric risk factors for infection (delivery at < 37 weeks' gestation, anhydrous interval of more than 18 h, body temperature above 38°C). Universal antenatal screening for GBS is used in the United States and Canada [7]. Screening based on risk factors used in Sweden and the UK is more cautious, as women are tested only if they show symptoms of a disease associated with GBS, such as preterm labor, or if they have a history of adverse pregnancy outcomes [8].

In Russia, since 2021, the Order of the Ministry of Health No. 1130n of 20.10.2020 "On Approval of the Procedure for the Provision of Medical Care in the Profile "Obstetrics and Gynecology" has been in effect, according to which screening of pregnant women for GBS is required at 35-37 weeks of pregnancy. According to this order, exclusively vaginal or both vaginal and rectal secretions are examined and bacteriologic examination is performed to isolate *S. agalactiae*. If GBS is isolated, antibacterial drugs are prescribed in labor to prevent antibiotic prophylaxis of antenatal infection of the fetus.

Currently, measures have been developed to prevent early GBS infections based on parenteral administration of antibiotics during labor to women with a high risk of transmission of newborn microorganism. While the efficacy of this method is not in doubt, the choice of



women for whom antibiotic prophylaxis is indicated is a matter of debate.

Although antibiotic prophylaxis is a good method of preventing vertical transmission of infection caused by *S. agalactiae* and reducing the incidence of infection in newborns, there is a risk of *S. agalactiae* resistance to antibiotics.

Vaccination of both pregnant women and women planning pregnancy is currently considered as a prophylaxis against the development of invasive forms of GBS infection in newborns. This strategy is based on the ability of maternal IgG to penetrate the placenta and provide immune protection not only against early-onset disease, but also against late-onset disease and postpartum complications associated with GBS. GBS occupies environmental niches (e.g., lower gastrointestinal tract and vaginal mucosa) that are relatively immunologically inert. In fact, a significant proportion of women colonized with GBS have low serum IgG concentrations to CPS, and these women pose a high risk of early infection with their newborns [9]. The development of a safe and effective vaccine that can be administered during or before pregnancy remains a major goal, as current antibiotic-based therapeutic prophylaxis strategies do not eliminate all cases of invasive infections caused by GBS.

Vaccine development is aimed at determinants of *S. agalactiae* that colonize the vaginal biotope and are capable of invasion. CPS was recognized as the most promising of them, on the basis of which scientists from the USA and South Africa developed a trivalent vaccine in 2013, which is successfully undergoing clinical trials [10].

In 2017, clinical trials of a polyvalent vaccine targeting serotypes Ia, Ib, II, III, and V of GBS were initiated. At the same time, an increase in the number of infections caused by serotype IV of GBS was noted, so this serotype was added to the hexavalent vaccine. This vaccine achieved coverage of 98% of neonatal infections caused by GBS.

The new hexavalent conjugated GBS vaccine (GBS6) targets serotypes Ia, Ib, II, III, IV, and V of GBS [11], which are prevalent worldwide. Monovalent, bivalent, and trivalent vaccines against serotypes Ia, Ib, II, III, and V of GBS have been previously studied in non-pregnant and pregnant women. These vaccines have been shown to be safe and to cause a post-vaccine increase in antibodies to GBS in infants and vaccinated individuals. However, there are no licensed vaccines against GBS infection yet [11]. The task is also complicated by the proportion of capsule-free GBS strains, which is as high as 10% in some populations.

Another promising target is the surface proteins and pili proteins of GBS.

A large systematic review of all existing GBS vaccine candidates was conducted in 2024. All GBS vaccine candidates demonstrated good immunogenicity

and safety data for non-pregnant and pregnant women. The most promising candidate vaccines are a CPS-based polyvalent vaccine or a broad-spectrum surface subunit protein vaccine. Overall, the discovery of these molecular virulence factors of GBS identifies several promising targets for prophylactic vaccine development. This systematic review also emphasizes that there are still significant uncertainties in the determinants of antibody response, especially in individuals with low baseline levels of antibodies to GBS [12].

To reduce perinatal morbidity and mortality, more attention should be paid to clinical practice, screening, widespread detection and treatment of possible maternal and child infection with GBS, and prevention of antenatal fetal and neonatal infection. Monitoring of circulating strains of GBS in the region will allow to evaluate the strategy of prevention of invasive neonatal infections.

**The aim** of this study was to determine the molecular genetic determinants of virulence of GBS isolated from pregnant women and newborns, and to monitor the distribution of CPS types and pili profiles of GBS strains in St. Petersburg and the Leningrad region.

## Materials and methods

Clinical isolates of GBS isolated from pregnant women in the third trimester of gestation and neonatal infections in 2010–2023 at the D.O. Ott Research Institute of Gestational Diseases were used in the study. Clinical materials in women included the middle portion of freely released urine, vaginal and/or cervical canal secretions and rectal mucosa; in newborns – secretions of the posterior pharyngeal stalk, nasal cavity, surface of the external auditory canal, axillary skin, and meconium.

The study was conducted with the voluntary informed consent of the patients and legal representatives of newborns; the study protocol was approved by the local ethical committee of the D.O. Ott Research Institute of AG&R (protocol No. 114 of 14.12.2021).

Clinical materials were examined by bacteriological method using selective nutrient broth (Todd-Hewitt broth) containing colistin sulfate, nalidixic acid and oxolinic acid, which inhibit associated microbiota, and on Mueller-Hinton agar with addition of 5% defibrinated blood. The isolated streptococci were identified using the SAMR test and by MALDI-TOF protein profiling (Bruker). For further studies, the strains were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  in trypticase-soy broth supplemented with 30% glycerol.

Bacterial DNA extraction was performed using AmpliPrime DNA-Sorb-AM DNA extraction reagent kit (Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor) according to the manufacturer's instructions.

Serotype and pili variant were determined by polymerase chain reaction (PCR), for which Tersus plus

PCR kit (Eurogen) was used. Thermocycling was performed using the Terzik amplifier (DNA-Technology). To determine the types of CPS, the method proposed by K. Yao et al. [13].

The pili type was detected using the method developed by S. Teatero et al. [14]. The method includes two PCR reactions. The first reaction is multiplex; it contains a mixture of 4 primer pairs to the genes of PI loci (Pilus islands) — PI-1, PI-1b, PI-2a, PI-2b, the amplicons of which differ in size. The second reaction contains a pair of primers corresponding to the start and end of 2 genes flanking the PI-1 prophage locus. If the prophage is absent, these primers amplify only the genes flanking the prophage, corresponding to 648 nucleotide pairs. This reaction is used as a control for PI-1-negative isolates.

PCR with primers to the *gbs2018-ST-17* gene was used to determine hypervirulent ST-17. If the GBS strain was classified as hypervirulent ST-17, a 210 bp amplicon was obtained.

DNA electrophoresis in 2% agarose gel was used to separate the amplicons obtained. The DNA length marker 100+ bp DNA Ladder (Eurogen) was used to establish the molecular size of the amplicons. The results were visualized using the Infinity gel documentation system (VilberLourmat).

#### Statistical processing of data

For statistical processing of data, we used the R v. 4.3.0 software. The study is observational, which included 100% of available study cases for 2010–2011, 2016–2020 and 2021–2023, so power was not checked. The proportions of patients with a given feature are presented both in absolute values ( $n/N$ , where  $n$  is the number of patients with the feature,  $N$  is the group size) and as relative units (%) with confidence interval (CI) calculated using the Klopfer–Pearson method. The difference between the fractions was evaluated using Fisher's exact test. In the case of multiple comparisons, the Hill correction was applied. The critical level after which the null hypothesis was rejected was accepted at  $p = 0.05$ .

### Results

To monitor the distribution of CPS genotypes and pili profiles in GBS isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg and Leningrad region in 2010–2023, we examined 420 clinical isolates of GBS. We divided these clinical isolates into the periods 2010–2011, 2016–2020, and 2021–2023. The observation periods were chosen because a 10-year comparative evaluation of GBS virulence factors and antibiotic resistance was performed in the above periods. In 2021–2023, new data began to accumulate as the monitoring of GBS continued, and this period was also taken for analysis.

**Table 1** presents data on the distribution of CPS in clinical isolates of GBS isolated from pregnant women

and newborns in St. Petersburg and Leningrad Region in different periods. In the region, genotypes Ia, III, and V CPS of GBS were dominant during all periods of observation, while genotypes VI, VII, and IX were rare. Genotype VIII was absent throughout the entire observation period. During the 13 years of follow-up, the frequency of detection of different GBS genotypes varies. Thus, from 2010–2011 to 2021–2023, the frequency of genotype Ib (from 0.7% to 6.7%;  $p = 0.015$ ) and genotype V (from 12.1% to 24.4%;  $p = 0.02$ ) increased, while the prevalence of genotype III decreased significantly (from 41.1% to 21.1%;  $p = 0.003$ ). It should be noted a negative dynamic in the frequency of detection of genotypes Ia, Ib, III, which are included in the trivalent vaccine, from 76.6% to 54.4% (Table 1). The detection of 6 genotypes (Ia, Ib, II, II, II, IV, V) remained above 95.0%. This distribution of genotypes indicates that a hexavalent CPS-based vaccine would be effective in our region. These changes require close attention and continuous monitoring, especially with the prospect of creating prophylactic vaccines.

These data are more clearly presented in the **Figure**, which shows the dynamics of the increase in the frequency of detection of genotypes Ib, V and a decrease in the frequency of detection of genotype III of GBS.

Detection of CPS in a pregnant woman before delivery is a prognostic factor for newborn colonization by CPS (with vertical transmission of the pathogen). It was important to evaluate the frequency of detection of CPS genotypes in mothers and their newborns. In our study, 199 mother-newborn pairs were identified. CPS was detected in all mothers and neonatal infection colonization was 52.76% (45.84–59.58%).

Genotypes III (17.0%), Ia (16.1%) and V (10.5%) were most frequently identified in the mother-newborn pair. Genotypes IV, VII and IX were found in 0.5% of cases. Genotypes VI and VII were rare in our population and were not isolated in the mother-newborn pair. All presented genotypes isolated in the mother matched the genotypes isolated in newborns (**Table 2**).

GBS isolates isolated from 2021–2023 were analyzed for belonging to hypervirulent ST-17. Of the 90 GBS isolates isolated from pregnant women and newborns, hypervirulent ST-17 was detected in 6 (6.7%) GBS isolates belonging to genotype III. 2 children born to these 6 women also had GBS isolated with this sequencing type, but they did not show signs of GBS infection.

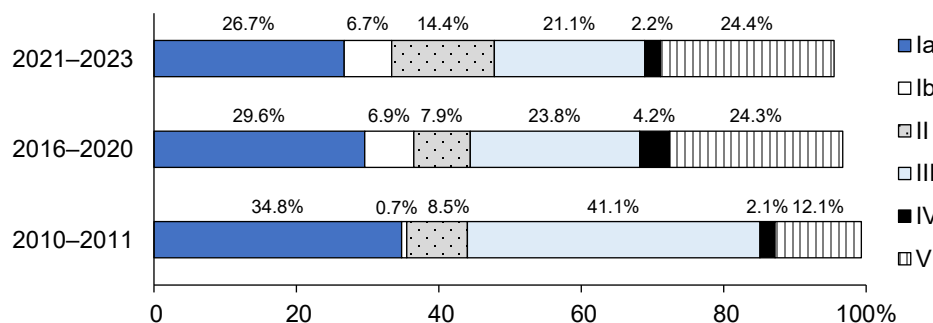
**Table 3** presents data on the distribution of pili genotypes of *S. agalactiae* isolated from pregnant women and newborns in St. Petersburg during different periods of observation.

More than half of all *S. agalactiae* clinical isolates distributed in our region had pili of genotype PI-1 + PI-2a, which was 53.9% in 2010–2011, 58.2% in 2016–2020, and 48.9% in 2021–2023, a difference statistically insignificant. PI-2a (30.5% in 2010–2011, 24.9% in

**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)

Genotype	2010–2011 ( <i>N</i> = 141)	2016–2020 ( <i>N</i> = 189)	2021–2023 ( <i>N</i> = 90)	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%)

**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.



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.

2016–2020, and 21.4% in 2021–2023 ( $p > 0.05$ ) and PI-1 + PI-2b pili genotypes were the next most common (frequency of detection was 12.1% over the entire follow-up period). The PI-2b GBS genotype was one of the rarest, which is also consistent with studies conducted in Europe. The GBS genotype including the recently described PI-1b locus was, as expected, extremely rare.

### Discussion

In this study, we tracked the changes in CPS *S. agalactiae* genotypes among pregnant women and newborns in St. Petersburg and Leningrad region. In our region, CPS genotype Ia was dominant in 2010–2011 and was detected in 34.8% of cases, in 2016–2020

it was found in 29.6% and currently in 26.7%. During the entire follow-up period, one third (30.7%) of all clinical isolates of GBS belonged to genotype Ia. Genotype III was the second most common genotype. However, there was a change in the frequency of detection of genotype III of GBS over the 13 years, namely a significant decrease from 41.1% in 2010–2011 to 21.1% in 2021–2023 ( $p = 0.003$ ). Thus, the dominant genotypes over the entire surveillance period remain Ia, III and V. These data are consistent with those obtained in other countries. Genotypes III, Ia, and V were the most common genotypes of GBS in several regions (Europe and North America, East Asia, South, East/Central Africa, and Australia/New Zealand) [17]. The most common

**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

Genotype	Mother neonate pairs, N = 105	
	n	% (95% 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)

GBS genotype colonizing pregnant women worldwide was genotype III, occurring at an incidence of 25% (95% CI 23–27%), and genotype Ia, detected in 19% (95% CI 17–21%) of women [17].

Genotype IV was found in Europe and North America at a frequency of 4%, and in South Africa at 3%. Genotypes VI–IX were rarely detected in Europe (1%) [17]. In St. Petersburg and the Leningrad Region, genotypes VI, VII, and IX were rare (1; 1.2; 0.5%, respectively). Genotype VIII was never detected throughout the entire observation period.

It should be noted that according to the results of our study, the frequency of occurrence of genotype Ib, which is one of the vaccine components, increased from 0.7% in 2010–2011 to 6.7% in 2021–2023 ( $p = 0.015$ ).

Globally, Ia, Ib, II–V genotypes cover more than 99% of all cases of GBS infections, including early and late neonatal infection [18]. In our region, the coverage of these genotypes is (99% to 95.5% at different periods of follow-up). These changes require close monitoring of the represented genotypes for vaccine development.

The vertical transmission rate of GBS in mother-newborn pair in our study was 52.76% and overlap of molecular genetic characteristics among GBS-positive mother-newborn pairs was shown. The same CPS genotypes were dominant in the mother-newborn pair. According to different authors, the frequency of vertical transmission from GBS colonized mothers ranges from 54.2% in Turkey to 14.1% in China [19].

According to the literature, hypervirulent ST-17 GBS strains are associated with the risk of neonatal invasive infections. We detected this sequencing-type of GBS in 6 women and 2 newborns. When hypervirulent ST-17 strains of *S. agalactiae* in pregnant women, their newborn children should be monitored, as they fall into the risk group for early and late infection and have an increased risk of meningitis [20].

The main limitation of CPS-based vaccines is the need to provide protection against multiple serotypes, so multivalent vaccine strategies are of great interest. The Novartis/GSK trivalent vaccine (Novartis/GSK GBS3) containing a CPS Ia/Ib/III conjugate is considered safe for pregnant women, induces the production of high maternal antibody titers, and the antibodies are transmitted transplacentally to the fetus [21]. Unfortunately, the trivalent vaccine still does not include all clinically relevant GBS genotypes and may lead to selection of non-vaccine strains by capsule replacement, a phenomenon that has been observed in many high-risk populations and among ST-17 strains [20].

According to our data, the efficacy of the trivalent vaccine in pregnant women in 2010–2011 would be 76.6%, in 2016–2020 — 60.3%; currently, its efficacy is only 54.4%. The task is also complicated by the proportion of capsule-free GBS strains, which is as high as 10% in some populations. A new hexavalent (serotypes Ia, Ib, II, III, IV, and V) conjugated GBS vaccine (GBS6) [11], which accounts for approximately 98% of the pathogenic GBS genotypes that are prevalent worldwide, has been investigated. Monovalent, bivalent and trivalent vaccines against genotypes Ia, Ib, II, III and V

**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)

Pilus	2010–2011	2016–2020	2021–2023	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%)

of GBS have been previously studied in non-pregnant and pregnant women. These vaccines have been shown to be safe and to cause a post-vaccine increase in antibodies to GBS in newborns and vaccinated women. There are no licensed vaccines against diseases caused by GBS [11]. However, the presence of new genotypes and atypical GBS isolates, as well as the possibility of genotype switching, support the need for continuous genotype surveillance to contribute to the development of a universal vaccine [10, 12].

Not only the capsule but also the pili is an important factor in increasing the virulence of GBS. Most GBS contain PI-1 + PI-2a, and the presence of these pili stabilizes colonization [22]. The combination of PI-1 and PI-2a was predominant among GBS isolates colonizing 38% of pregnant women, PI-2a in 32%. The largest proportion of genotypes with pili islet protein genes was genotype Ia — 69% (PI-2a only) and genotype III — 85% of strains (PI-1 and PI-2b) [23].

I. Margarit et al. demonstrated in an extensive study of GBS pili on a large collection of clinical isolates that

all GBS isolates contain at least one or a combination of two PIs, and a pili-based vaccine would provide sufficient widespread protection [24]. More than half of all *S. agalactiae* clinical isolates distributed in our region had pili of genotype PI-1 + PI-2a. The next most common genotypes were PI-2a (24.9 to 34.4%) and PI-1 + PI-2b (12.1%) pili genotypes. As our studies show, the distribution of pili genotypes did not change during the observed period. The data we obtained coincide with those obtained in the USA and European countries [7]. It is important to note that a vaccine based on pili components would have been effective throughout the entire period.

### Conclusion

Despite fruitful research in recent years, our understanding of the dual role of GBS as a commensal and pathogen is still far from complete. More fundamental studies that unravel the molecular basis of virulence factors and host response to GBS are necessary to develop new prophylaxis methods that may be effective in preventing GBS infections in newborns.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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>
- Хван В.О., Шипицина Е.В., Запирская 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>
- 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.
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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)
- Bjerkhaug A.U., Ramalingham 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Liu Y., Liu J. Group B streptococcus: virulence factors and pathogenic mechanism. *Microorganisms.* 2022;10(12):2483. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122483>
- 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>
- 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>

**Information about the authors**

*Kira V. Shalepo*<sup>✉</sup> — 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

**Информация об авторах**

*Шалепо Кира Валентиновна*<sup>✉</sup> — 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>

*Сажников 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 Алевтина 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; *Сажников 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



## Genotyping of *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the Kaliningrad region

Mikhail Yu. Kartashov<sup>1,2</sup>, Evgenii G. Volchev<sup>3</sup>, Ekaterina I. Krivosheina<sup>1</sup>, Kirill A. Svirin<sup>1</sup>, Vladimir A. Ternovoi<sup>1</sup>, Valery B. Loktev<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Novosibirsk Region, Koltsovo, Russia;

<sup>2</sup>Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

<sup>4</sup>Institute 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 Rospotrebnadzor (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>



Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-503>

# Генотипирование боррелий, риккетсий и анаплазм в клещах *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus* в Калининградской области

Карташов М.Ю.<sup>1,2</sup>, Волчев Е.Г.<sup>3</sup>, Кривошеина Е.И.<sup>1</sup>, Свириин К.А.<sup>1</sup>,  
Терновой В.А.<sup>1</sup>, Локтев В.Б.<sup>1,2,4</sup>✉

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия;

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup>Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия;

<sup>4</sup>Институт 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 *rbp66* показало наличие ДНК боррелий четырех видов: *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* и *B. lusitanae*. 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., Свириин 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/pebbmx>

## Introduction

Ticks can be infected with pathogens of viral, bacterial and protozoan nature [1–3]. In addition to fairly well-studied pathogens, which include tick-borne encephalitis virus and ixoid borreliosis pathogens, other microorganisms that cause human diseases may be present in ticks, including in European countries [2, 4–6]. Tick-borne infections are a common group of zoonotic diseases in Russia [7, 8]. The structure and characterization of tick-borne infections, including genotyping of their pathogens, in the European part of

Russia is not sufficiently studied [9]. In recent years, cases of human tick-borne infections have been associated with ticks *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), *I. pavlovskiyi* (Pomerantzev, 1946), *Dermacentor reticulatus* (Fabric, 1794), *D. marginatus* (Sulzer, 1776), and *D. nuttali* (Olenev, 1928) in Siberian and Far Eastern regions of Russia [8, 10]. In the European parts of Russia, *I. ricinus* ticks are widely distributed (Linnaeus, 1758), which are prevalent in the western regions of the country. Interestingly, the appearance of *D. reticulatus* ticks is noted in urban and suburban biotopes [8, 11].

Primers using for isolation gene fragments of *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* from ixodes ticks

Primer	Primer sequence (5'→3')	Temperature, °C	Size, bp	Reference
Borr2rF	CGAATTAGGCAAAGACGATCC	56	548	[8]
Borr2rR	TTTCATAAGCTCCTGATAAGCCA			
CS409d	CCTATGGCTATTATGCTTGC	56	769	[16]
RP1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA			
MSP2-3f	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	55	334	[17]
MSP2-3r	GCCAGTAACAACATCATAAGC			

For example, in Tomsk, their numbers increased more than 200 times for urban biotopes, and the infection rate of *D. reticulatus* ticks was approximately 44–48% for *Rickettsia* spp., 0.7–0.9% for tick-borne encephalitis virus, and 0.6% for *Anaplasma phagocytophilum*.

Earlier in *I. ricinus* ticks located in the Leningrad and Kaliningrad regions, 4 species of *Borrelia* were presumably detected by PCR at an infection rate of 11.5% [12]. Later, taiga ticks (*I. persulcatus*) were detected in park areas of St. Petersburg on the Baltic Sea coast with an infection rate of 9.3% with borreliae genotyped as *B. afzelii* and *B. garinii* [13]. In Finland, the infection rate of *I. ricinus* and *I. persulcatus* infected with various tick-borne pathogens reached 30% with a significant predominance of *Borrelia burgdorferi sensu lato* [14]. At the same time, *I. ricinus* ticks were significantly more frequently infected and co-infected with various bacterial and protozoan pathogens.

In the Kaliningrad region in 2022, 5379 people sought medical help due to tick bites<sup>1</sup>. Only cases of viral tick-borne encephalitis and ixoid tick-borreliosis are diagnosed annually in patients who are traditionally associated with *I. ricinus* ticks: 3 cases of tick-borne encephalitis and 49 cases of tick-borreliosis were reported in 2022. The circulation of other tick-borne pathogens and their species affiliation have not been described.

**The aim** of this study was to detect, study species affiliation and genotyping of *Borrelia*, *Rickettsia* and *Anaplasma* detected in ixodid ticks collected in different biotopes of the Kaliningrad region.

## Materials and methods

Mites were collected from vegetation using the "per flag" method in different biotopes of the Kaliningrad region in 2021–2022. Geographical coordinates of biotopes and the number of mites collected in biotopes are presented in the Appendix on the journal's website. Species identification of ticks was carried out by morphological method [15].

<sup>1</sup> State report "On the state of sanitary and epidemiological changes in the population in the Kaliningrad region in 2022." Kaliningrad; 2023. 238 p. URL: [https://39.rospotrebnadzor.ru/sites/default/files/doklad\\_o\\_goskontrole\\_zh\\_2022\\_kaliningradskaya.pdf](https://39.rospotrebnadzor.ru/sites/default/files/doklad_o_goskontrole_zh_2022_kaliningradskaya.pdf)

## Nucleic acid isolation

Ticks were treated twice with 70% ethanol to inactivate infectious agents and washed with phosphate-buffered saline. Homogenization of the obtained samples was performed using a laboratory homogenizer TissueLyserLT (Qiagen) in 300 µl of sterile physiological saline. The nucleic acid isolation was performed from 100 µl of homogenate using the AmpliPrime RIBO-prep reagent kit (NextBio) according to the manufacturer's instructions.

## PCR testing

Screening of the obtained samples for the presence of genetic markers of the studied pathogens was carried out by PCR using specific primers (Table) on a thermocycler T-1000 (Bio-Rad) in 25 µl of the reaction mixture of the following composition: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.25 mM of each primer, 1.5 units of HS-Taq polymerase activity (Eurogen) and 1–100 ng of DNA matrix. The following temperature regimes were used for PCR: preliminary activation of polymerase — 95°C for 5 min; 38 cycles: 95°C — 20 s, T<sub>anneal</sub> — 20 s, 72°C — 1 min; final elongation at 72°C — 4 min.

The amplicons were detected by gel electrophoresis in 2% agarose gel in Tris-acetate buffer containing 0.1% ethidium bromide. Amplification products were purified from agarose gel using a microcolumn-based kit (Biosilica).

## Sequencing and nucleotide sequence analysis

Sanger sequencing was performed using the Big-Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Nucleotide sequences were determined by capillary electrophoresis using a 3130xl Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems). Analysis of the obtained nucleotide sequences was performed using the UniproUGENE v. 1.46 program. The obtained nucleotide sequences were compared with previously published sequences in GenBank using the BLAST search application. The nucleotide sequences were aligned using the MUSCLE algorithm in the MEGA X software. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences was performed by the maximum likelihood

method using the Tamura-Nei evolution model to analyze genetic relationships/clustering of nucleotide sequences. The statistical reliability indices of phylogenetic tree nodes were calculated by bootstrap analysis using 1000 random replicates.

### Deposit of nucleotide sequences

The following nucleotide sequences were deposited in the GenBank database: fragments of the *msp2* gene of *A. phagocytophilum* (OR488786-OR488799); *p66* gene fragments of Borrelia: *B. afzelii* (OR488840-OR488890), *B. garinii* (OR488891-OR488929), *B. valaisiana* (OR488930-OR488948), *B. lusitanae* (OR48898949-OR488967); Rickettsiae *gltA* gene fragments: *R. helvetica* (OR496610-OR496611) and *R. conorii* subsp. *raoultii*, hereafter as the basionym of *R. raoultii* (OR496612-OR496613).

The studies were conducted in compliance with the biosafety rules regulated in MU 1.3.2569-09, SP 1.3.3118-13, SP 3.1.3310-15.

## Results

We collected and analyzed 1665 individual samples of nymphs and imago of *I. ricinus* ( $n = 862$ ) and *D. reticulatus* ( $n = 803$ ) ticks from 33 urban, suburban and characteristic natural biotopes of the Kaliningrad region (Fig. 1). The biotopes studied were subdivided according to the species of ticks collected in them as follows: 11 biotopes in which only *I. ricinus* ticks, 9 biotopes with *D. reticulatus* ticks and 13 biotopes with 2 tick species. Quite unusually, in fact, half of all collected mites were attributed to the meadow mite, which was found in 2/3 of the biotopes studied and absolutely prevailed in 9 of them.

The infection rate of *I. ricinus* Borrelia infection was 15.5% (128/862; 95% CI 13.2–18.1). Determination of the nucleotide sequence of a fragment of the *p66* gene with a length of about 560 bp among 128 samples revealed Borrelia of four species from the *B. burgdorferi* s.l. complex: in 51 ticks, DNA of *B. afzelii* (39.9%; 95% CI 31.8–48.5), in 39 — *B. garinii* (30.5%; 95% CI 23.2–38.5), in 19 — *B. valaisiana* (14.8%; 95% CI 9.7–

22.0), in 19 — *B. lusitanae* (14.8%; 95% CI 9.7–22.0) were detected. No Borrelia genetic material was detected among the studied samples of ticks of *D. reticulatus* species. Phylogenetic analysis showed that Borreliae detected in *I. ricinus* ticks in the territory of the Kaliningrad region cluster with prototypic sequences isolated primarily in European countries (Fig. 2). Sequence analysis of the fragment of the *p66* gene of *B. afzelii* revealed 6 alleles of this gene, for *B. garinii* isolates 8 allelic variants differing from each other by 1–14 nucleotide substitutions were detected, and *B. valaisiana* and *B. lusitanae* isolates had 2 and 4 substitutions.

The rickettsial infection rate in ticks was 11.5% (191/1665; 95% CI 10.2–13.1%). Among *I. ricinus* ticks, Rickettsia DNA was detected in 22 samples and the infection rate was 2.6% (22/862; 95% CI 1.7–3.8%). All identified Rickettsia isolates from *I. ricinus* ticks were attributed to *R. helvetica* by a fragment of the citrate synthase gene (*gltA*). When analyzing the nucleotide sequences of the *gltA* gene, two main genetic variants of *R. helvetica* circulating in the Kaliningrad region were identified. They differ from each other by 2 synonymous nucleotide substitutions (the level of homology between the genetic variants is 99.8%). One of the genetic variants corresponds to the previously described variants of *R. helvetica* found in the Komi Republic and Omsk region [9, 18], the other genetic variant differs from the known sequences.

In 21.1% of *D. reticulatus* ticks, Rickettsia DNA was detected (169/803; 95% CI 18.4–24.0%), which was genotyped as *R. raoultii*. Phylogenetic analysis of *R. raoultii* revealed the existence of two variants differing by a single synonymous substitution (Fig. 3). In general, these genetic variants correspond to a wide range of *R. raoultii* isolates circulating in Europe, Russia and China [19, 20].

*A. phagocytophilum* DNA was detected by PCR in 12 samples of ticks of the species *I. ricinus* (1.4%; 95% CI 0.8–2.5%) and in 2 samples of *D. reticulatus* ticks (0.2%; 95% CI 0.1–0.9%). The nucleotide sequences of the *msp2* gene fragment of approximately 340 bp in length were determined in the detected *A. phagocytophilum* isolates, followed by phylogenetic analysis (Fig. 4). Three *A. phagocytophilum* genetic variants with a homology level of 98.6%, identical or closest to *A. phagocytophilum* isolates circulating in Norway and Poland, were detected in the Kaliningrad region.

Two tick samples contained simultaneously genetic material of *B. afzelii* and *R. helvetica*, one tick sample contained DNA of *B. valaisiana* and *A. phagocytophilum*.

## Discussion

The results of regular long-term field observations show that the main recreational landscapes of the Kaliningrad region, including landscapes of the Baltic Sea coast, have established populations of ixodid ticks. The

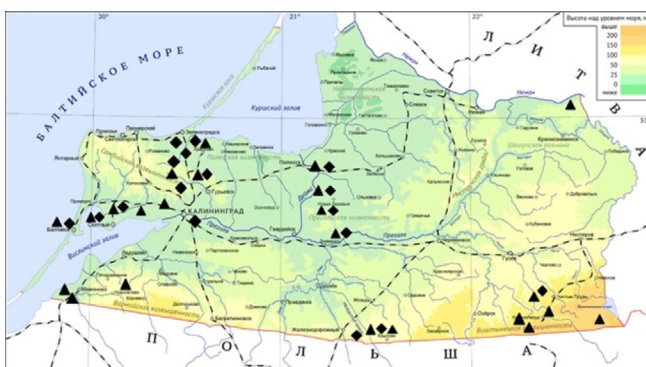
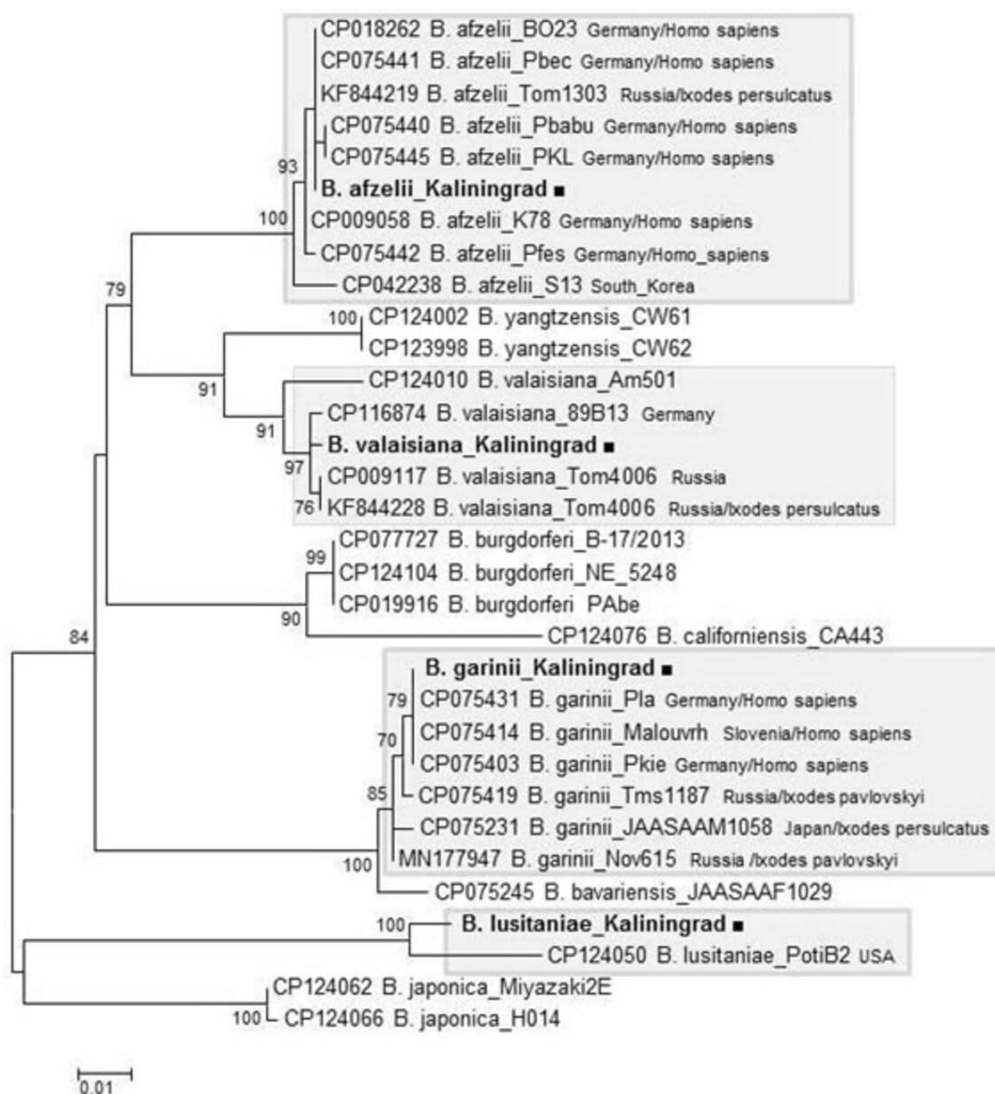


Fig. 1. Locations of biotopes in the Kaliningrad region, where ixodid ticks were collected in 2021–2022.



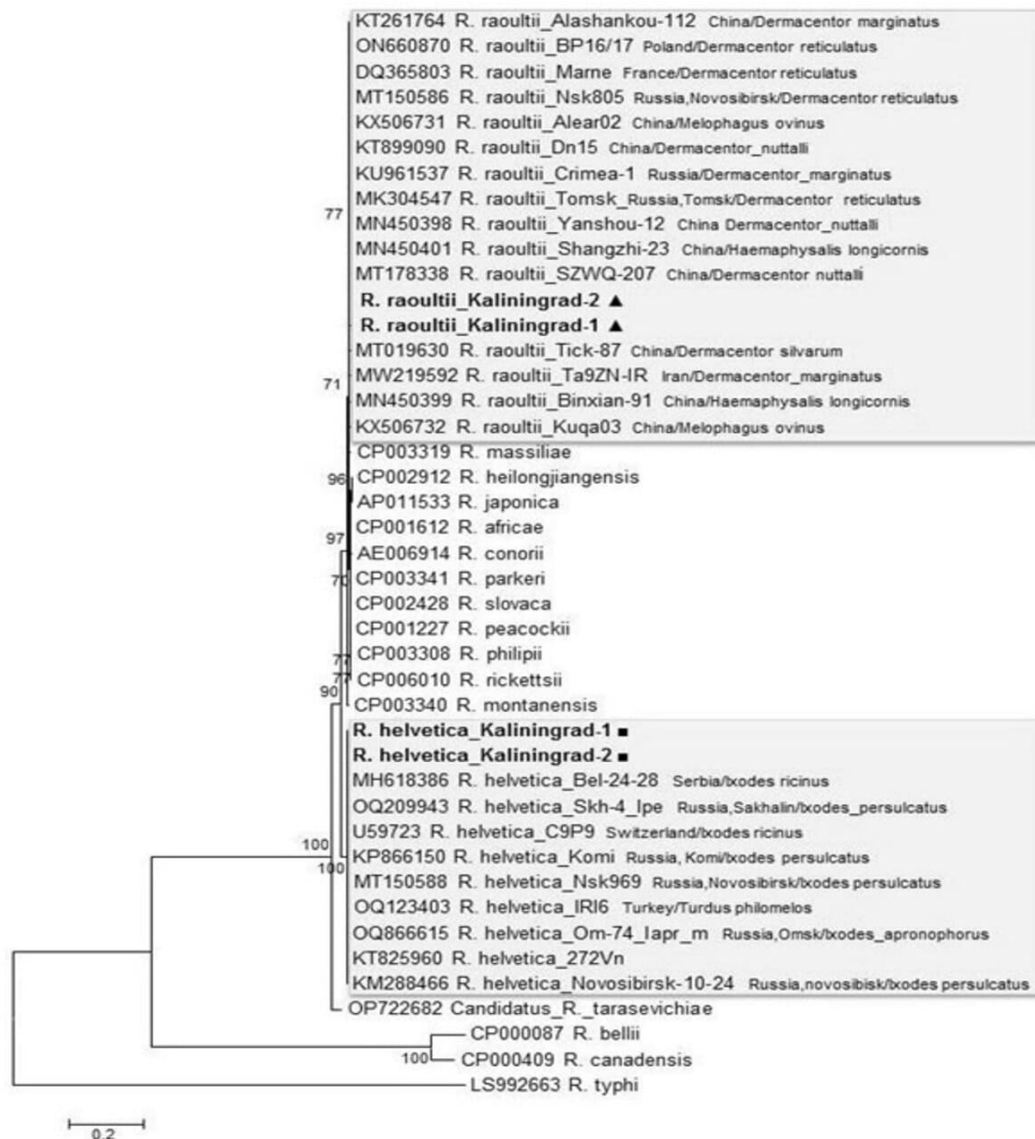
**Fig. 2.** Dendrogram of nucleotide sequences of the *p66* gene fragment for detected borrelia isolates. Black squares — sequences derived from *I. ricinus* tick.

activity of ixodids in zones with pronounced anthropogenic load is significantly higher than in similar landscapes with insignificant anthropogenic load. Thus, in recent years, 4194–7300 people seek medical help for tick bites. Every year 2–16 cases of viral tick-borne encephalitis and 35–132 cases of ixoid tick-borne borreliosis are diagnosed. This repeatedly increases the risks of human contact with ixodid ticks, which can lead to human infection with various tick-borne pathogens.

Tick-borne borrelioses occupy an important place in the structure of infectious pathology in the Kaliningrad region. In ticks of the Kaliningrad region we detected and genotyped *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. lusitaniae*, which are considered pathogenic for humans, and *B. valaisiana*, the pathogenicity of which is under discussion [21]. The infection rate (15.5%) correlates with earlier studies in the Leningrad and Kaliningrad regions [12]. *B. afzelii* and *B. garinii* are the most common pathogens of tick-borne borreliosis in humans and

are most often found in *I. ricinus* ticks. Circulation of *B. lusitaniae* was shown for the first time in the territory of the Kaliningrad region. It should be noted that *B. lusitaniae* is mainly distributed in the countries of the Mediterranean region, such as Portugal, Morocco and Tunisia. In more northern latitudes, this pathogen was detected in Austria, Slovakia, Ukraine and Latvia [22].

No genetic markers of borreliosis could be detected in *D. reticulatus* ticks, although a very representative sample of ticks of this species was examined. Previously, a similar situation was recorded in Tomsk, where 315 ticks of this species collected in urban biotopes were individually examined [11]. In Tomsk urban biotopes, a more than 200-fold increase in the number of *D. reticulatus* ticks was actually detected during 2015. It was the explosive increase in the abundance of *D. reticulatus* which allowed to collect a significant number of these ticks in 2016–2017 and assess their role in the transmission of tick-borne infections in Tomsk.



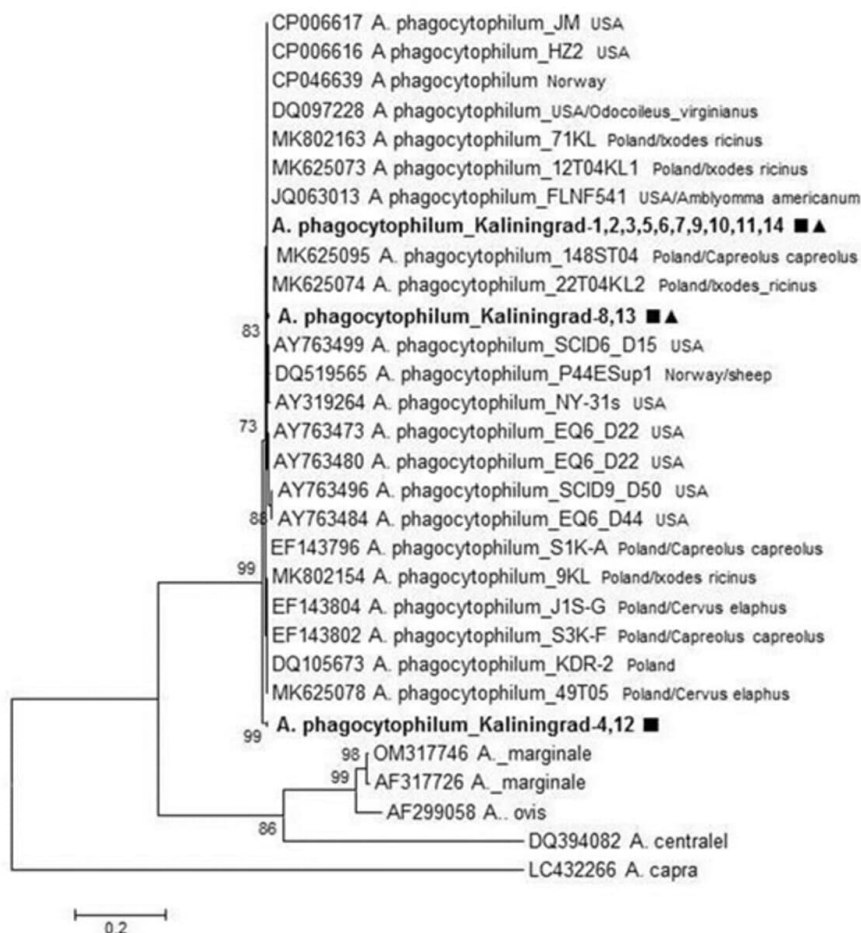
**Fig. 3.** Dendrogram of nucleotide sequences of the *gItA* gene fragment for identified *Rickettsia* isolates. Black triangles — sequences derived from *D. reticulatus* tick; black squares — sequences derived from *I. ricinus* tick.

Rickettsiae carried by ixodid ticks are infectious agents capable of causing human disease. In the Kaliningrad region, we managed for the first time to establish the fact of circulation of two species of Rickettsia from the tick-borne spotted fever group: *R. helvetica* and *R. raoultii*. The registered level of infection of *I. r. raoultii* ticks with *R. helvetica* in *I. ricinus* ticks amounted to 2.6%. In other countries of the Baltic region it ranges from 5 to 10% [23]. However, ticks of *D. reticulatus* species were infected with *R. raoultii* in 21.2% of cases. At the same time, in Lithuania and Latvia the similar indicator reaches 38%, in Germany — 80% [24, 25]. In Russia, the level of infection of *D. reticulatus* with this Rickettsia species can vary in different regions from 21.9% to 45%. *R. helvetica* DNA was found in *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. pavlovskyi* and *I. trianguliceps* ticks in different regions of northern Eurasia [10, 26, 27]. Human cases have been described,

with patients with rickettsiosis caused by *R. helvetica* showing fever, rare rashes, and cases of perimyocarditis and meningitis described.

*R. conorii* subsp. *raoultii* was described as a new Rickettsia species in 2008 after the study of the prototype strain of *R. raoultii* isolated in 2005 in Khabarovsk from *D. silvarum* ticks in Khabarovsk Krai [28]. In subsequent studies, *R. raoultii* was detected in *D. reticulatus*, *D. marginatus* and *D. nuttalli* ticks in a number of regions of the Asian part of Russia (Omsk region, Republic of Buryatia), Kazakhstan, China, and Mongolia [19, 20]. Rickettsiae genetically similar to *R. raoultii* have been identified in *Haemaphysalis hystricis* ticks in Japan and in *H. ornithophila*, *H. shimoga*, and *H. la-grangei* ticks in Thailand, as well as in *D. marginatus* ticks in Georgia, Turkey and European countries [29].

Serologic methods and DNA detection in the blood of patients confirmed the role of *R. raoultii* along with



**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

*R. slovaca* as etiologic agents of TIBOLA syndrome, which is associated with *Dermacentor* spp. genus ticks [30]. Patients develop an asthenic syndrome, and fever (> 38°C) is observed in a quarter of cases. For most patients, erythema persists for up to 1-2 months. If the tick bite is localized in the scalp, about one third of patients develop persistent baldness at the site of bite healing. At the same time, no cases of human rickettsioses in Kaliningrad region have been described so far.

The presence of *A. phagocytophilum* genetic material in *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks, revealed for the first time in this work, shows the active circulation of this pathogen in the Kaliningrad region. The level of infection of *D. reticulatus* and *I. ricinus* ticks (0.2% and 1.4%, respectively) corresponds to similar indicators for such countries as Denmark, Sweden, Norway and Germany, where the pathogen is found in 1–5% of ixodid ticks [23]. Phylogenetic analysis shows simultaneous circulation of at least 3 genetic variants of *A. phagocytophilum*. Human granulocytic anaplasmosis (HGA) was first described in the Russian Far East in 2000. Later confirmed cases of the disease were reported in Perm and Novosibirsk regions and in Altai.

The clinical course of HGA is very polymorphic: from mild, subclinical forms to extremely severe, fatal cases, which account for 0.5–1.0% and are usually associated with the development of secondary infections. The disease is characterized by the appearance of headaches and muscle aches, the development of fever. Less than half of patients may have nausea, vomiting, anorexia, diarrhea, abdominal and joint pain, cough. In most cases, leukopenia, thrombocytopenia, and elevated serum levels of liver aminotransferases and C-reactive protein are noted in HGA patients. HGA disease has not been registered in the Kaliningrad region.

High level of infection of ixodid ticks with Rickettsia and Anaplasma in the Kaliningrad region, presence of constant contacts of population with ticks allows to expect occurrence of cases of infection of people with Rickettsia spp. of tick-borne spotted fever group and Anaplasma spp. Diagnosis of these diseases may be difficult due to the imperfection of their laboratory diagnostics. These infectious agents are not cultured by classical microbiological methods, and the genetic material of the pathogens can be detected in clinical material from patients over a very narrow time range. This

actualizes studies on seroepidemiological monitoring of these infections in the population living in the Kaliningrad region to clarify their current distribution.

### Conclusion

In the collection of *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks, collected in 33 different biotopes in the Kaliningrad region in 2021–2022, DNA of 6 different species of tick-borne pathogens of bacterial and protozoan nature was detected. Sequencing of genome fragments of these pathogens and their phylogenetic analysis allowed to identify and genotype the following species of tick-borne pathogens: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *R. helvetica*, *R. raoultii* and *A. phagocytophilum*. *R. helvetica*, *R. raoultii* and *A. phagocytophilum* were detected for the first time in this region in both *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks. The obtained data confirm the necessity of continuous monitoring for circulation of pathogens of borreliosis, rickettsioses and anaplasmosis in natural foci of tick-borne infections in Kaliningrad region, further improvement of methods of diagnostics and prevention of these infections, including detection of possible cases of human cases of rickettsioses and HGA.

### 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/10.17420/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., Свиринов 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. tarasevichiae* 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>
- Rar V., Livanova N., Tkachev S., et al. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasit. Vectors*. 2017;10(1):258. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2186-5>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodinae*. Ленинград;1977. Filippova N.A. *Ixodid Ticks Subfamily Ixodinae*. Leningrad;1977.
- 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>
- 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>
- 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>
- 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 lusitaniae* 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., Samoylenko 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>



**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>

*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](mailto: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

**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>

*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](mailto: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 ИСМЖЕ, 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



## Полиморфизм генов рецепторов герминации спор у штаммов *Bacillus anthracis* основных генетических линий

Еременко Е.И.<sup>✉</sup>, 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<sup>✉</sup>, 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 геномов<sup>1</sup>:

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-

<sup>1</sup> 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 A

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 B

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 A, 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 B 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				B. cereus biovar anthracis					
	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	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	0,8	0,2	483	7	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

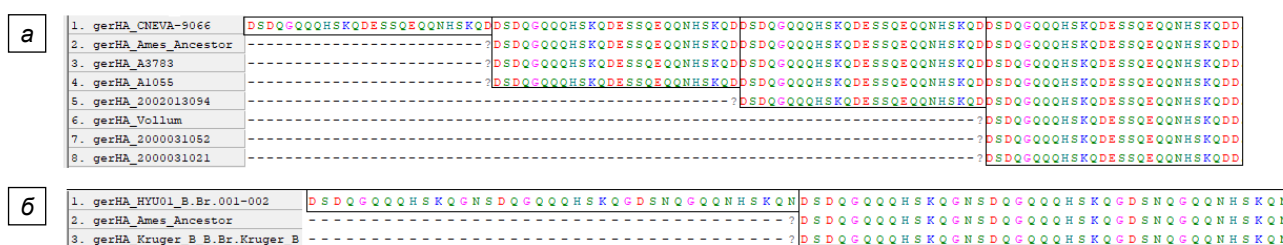


Рис. 1. Области гена *gerHA* с вариабельным числом тандемных повторов (транслированные последовательности).

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 B Tyrol 4675, BF1 и BF5 (группа B.Br.CNEVA) — несинонимичный SNP 211T→G (L71V). У штаммов линии B CNEVA-9066 и RA3 (группа B.Br.CNEVA), группы B.Br.001/002 и штамма Zimbabwe 89 группы B.Br. Kruger B, а также у штамма линии C ген соответствует референсному. Штамм Kruger B (группа B.Br. Kruger B) 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 B и C 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 B и C не вариабелен, у штаммов линии A 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 A и B хорошо известны, весьма необычные изоляты ветвей C были описаны совсем недавно. Открытие ветви C 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 уравновешивая 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 вариабельным 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 вариабельность как в пределах основных генетических линий, так и, особенно, между линиями. Вариабельность 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 вариабельности 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**<sup>✉</sup> — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, [ejer@mail.ru](mailto: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**<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Prof., chief scientist, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, [ejer@mail.ru](mailto: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. Akseanova** — 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; Akseanova 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.<sup>✉</sup>, 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- $\gamma$  (рИФН- $\gamma$ ), 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- $\gamma$  и интерлейкина-10.

**Результаты и обсуждение.** Изучение влияния ИЛП на выживаемость невакцинированных биомоделей позволило установить, что только рИФН- $\gamma$  и ПО увеличивают на 20–50% выживаемость двух типов лабораторных животных и значительно повышают значение ЛД<sub>50</sub>. 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- $\gamma$  и ПО, что коррелирует с показателями выживаемости животных.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения ИЛП, особенно рИФН- $\gamma$  и ПО, при защите макроорганизма от заражения *Y. pestis*, что определяет перспективность исследований по дальнейшему совершенствованию схем ЭП чумы. Цитокин ИФН- $\gamma$  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<sup>✉</sup>, 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- $\gamma$  — 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- $\gamma$  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- $\gamma$  and PO increase the survival of two types of laboratory animals by 20–50% and significantly increase the LD<sub>50</sub>. 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- $\gamma$  and PO, which correlates with animal survival rates.

**Conclusion.** The obtained data indicate the effectiveness of the use of IMD, especially rIFN- $\gamma$  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- $\gamma$ ), 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- $\gamma$ ), а также синтетический высокомолекулярный полиэлектrolит — азоксимера бромид (ПО). Все использованные ИЛП — российского производства, разрешены к применению у взрослых и детей с 2–3 лет, обладают наряду с иммуномодулирующим, детоксицирующим (ПО, О3), гепатопротективным (О1, рИФН- $\gamma$ , 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 (ImD<sub>50</sub>) [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.

### Иммунотенулирующие 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  $375 \pm 75$  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- $\gamma$  и ИЛ-10 — в клеточных культурах крови мышей определяли перед заражением на 3-и сутки после начала введения ИПП с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с применением коммерческих тест-систем («Abscam», «BioScience») на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Lazurit» («Dyplex 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 ИПП 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 <sub>50</sub> Dose of <i>Y. pestis</i> 231, LD <sub>50</sub>	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 <sub>50</sub> , КОЕ LD <sub>50</sub> , 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- $\gamma$ rIFN- $\gamma$	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.

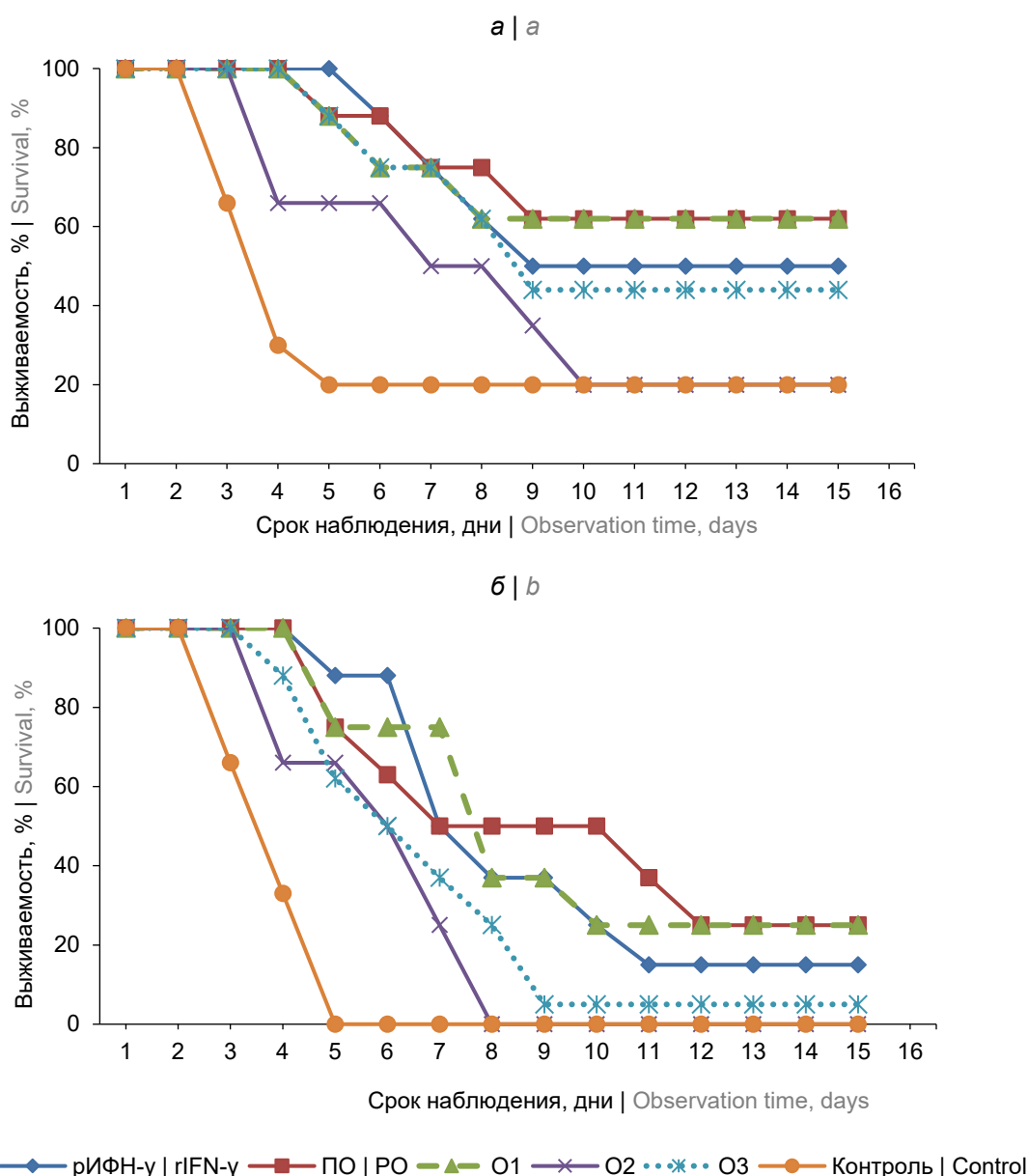
сона. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### 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 ЛД<sub>50</sub> 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 ЛД<sub>50</sub> *Y. pestis* 231 выживаемость снижалась



**Рис. 1.** Влияние ИЛП на продолжительность жизни белых мышей в условиях подкожного заражения 5 ЛД<sub>50</sub> (а) и 25 ЛД<sub>50</sub> (б) *Y. pestis* 231.

**Fig. 1.** The effect of immunomodulators on survival of white mice after subcutaneous challenge with 5 LD<sub>50</sub> (a) and 25 LD<sub>50</sub> (b) *Y. pestis* strain 231.

до 0–5%, кроме групп, иммунизированных рИФН- $\gamma$  (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- $\gamma$ , ПО и О3, на 24–96 ч в зависимости от типа биомодели и инфицирующей дозы вирулентного штамма (табл. 2). При применении рИФН- $\gamma$ , 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- $\gamma$  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- $\gamma$  и ИЛ-10 [19]. По данным имму-

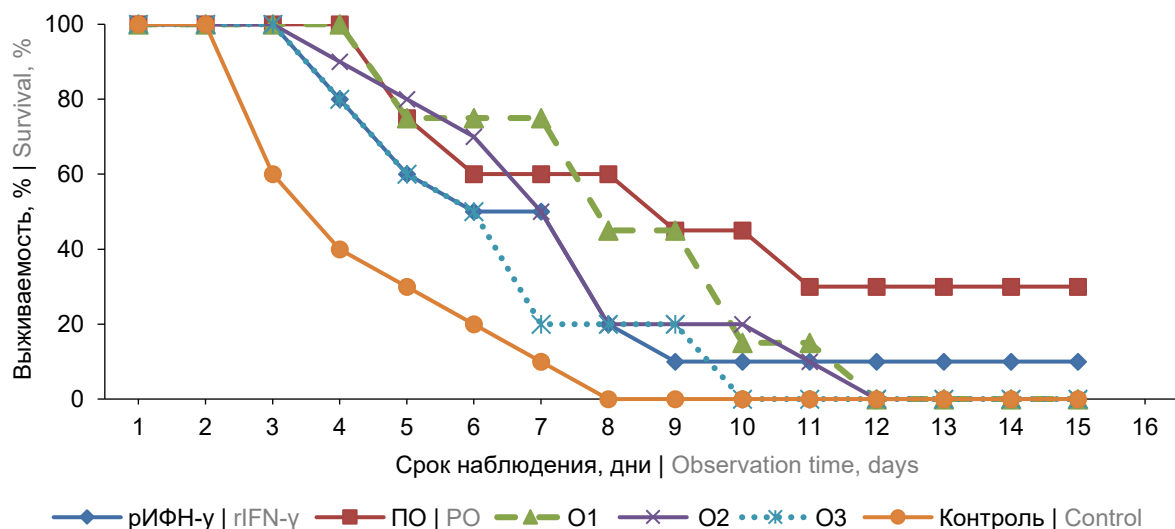


Рис. 2. Влияние ИЛП на продолжительность жизни морских свинок в условиях подкожного заражения 25 ЛД<sub>50</sub> *Y. pestis* 231.

Fig. 2. The effect of immunomodulators on survival of guinea pigs after subcutaneous challenge with 25 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* strain 231.

Таблица 3. Влияние трёхкратного введения ИЛП на уровень цитокинов у иммунизированных белых мышей Ме (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>)  
Table 3. The effect of three-time administration of immunomodulatory drugs on the level of cytokines in immunized white mice Me (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>)

Иммунизирующий препарат Immunizing medication	ИФН- $\gamma$ , пг/мл   IFN- $\gamma$ , 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- $\gamma$   rIFN- $\gamma$	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 иммулотропными 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- $\gamma$ . В данном исследовании эти ИЛП способствовали увеличению выживаемости и средней продолжительности жизни белых мышей, заражённых высоковирулентным штаммом чумы. Однако применение О1, О2 и ОЗ 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- $\gamma$  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- $\gamma$ , 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- $\gamma$ . Возможными средствами иммуномодуляции при ЭП чумы могут стать препараты рИФН- $\gamma$  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., Kuttyrev 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- $\gamma$ . *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<sup>✉</sup> — к.м.н., н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, [rusrap@microbe.ru](mailto:rusrap@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

#### Information about the authors

Anastasiya Yu. Goncharova<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Med.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, [rusrap@microbe.ru](mailto: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

## REVIEWS

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-492>



# Parvovirus B19 infection: characteristics of population immunity in the world

Oleg N. Nikishov<sup>1✉</sup>, Alexander A. Kuzin<sup>1</sup>, Irina N. Lavrentieva<sup>2</sup>,  
Anastasia Yu. Antipova<sup>2</sup>, Sergey N. Nikishov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>N.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>

Обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-492>

# Парвовирусная В19 инфекция: характеристика популяционного иммунитета в мире

Никишов О.Н.<sup>1✉</sup>, Кузин А.А.<sup>1</sup>, Лаврентьева И.Н.<sup>2</sup>, Антипова А.Ю.<sup>2</sup>, Никишов С.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

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

<sup>3</sup>Национальный 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, освещаю-



ших 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 B19, 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 B19 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>

## Introduction

Parvovirus (B19) infection (PVI) is an obligate anthroponosis of viral etiology mainly with an aerosol transmission mechanism, as well as transplacental and hemotransfusion routes of transmission, the main clinical symptom of which is infectious erythema, characterized by the appearance of a non-vesicular maculo-papular rash, clinically characterized by mild symptoms of general infectious intoxication, arthralgia, joint involvement, inflammatory changes in fetal tissues and the development of aplastic crisis in patients with hemolytic anemia [1-4]. The PVI pathogen is human parvovirus B19 (B19V) (Latin *parvo* — small), which was first discovered by British virologists Y. Cossart et al. in 1974–1975 during laboratory examination of a blood plasma sample from a healthy donor for the presence of HBsAg [5]. The researchers associated the name of the pathogen (B19V) with the well number of the plate containing the serum sample from which it was isolated.

The pathognomonic clinical manifestation of PVI is infectious erythema, described in the XVIII century by the English physician R. Willian long before its etiology was established [6]. However, only in 1899 German physician Sticker singled it out as an independent nosologic form, and in 1905 L. Cheinisse introduced infectious erythema into the classification and defined it as the fifth disease among the 6 classical exanthema [7, 8]. The pathogenic effect of the virus was established only in 1981, when researchers found a correlation between infection of children with squamous cell anemia and the development of aplastic crisis in a number of cases [9]. In 1983, the etiologic role of B19V in the occurrence of infectious erythema was confirmed [10]. In 1984, there were already reports about the development of fetal hydrocele on the background of intra-

uterine infection with B19V, which ended in premature termination of pregnancy and its death [4, 12]. These scientific facts indicate the expansion of PVI epidemiologic significance and allow us to identify risk groups among people most susceptible to the development of complications of B19V infection. Due to the emergence of specific laboratory diagnostics in modern conditions, the geography of PVI case registration has also expanded. More specifically, it is etiologically confirmed in the territories of South-East Asia, the USA, Europe, and Russia [13]. The epidemic process of PVI is characterized by cyclicity: there are large (10-year) and small (every 3–4 years) cycles.

It should be noted that the taxonomic position of B19V has been revised several times, and the chronology of these changes from 1991 to the present is presented in **Table 1**. B19V was officially classified into the parvovirus family in 1985 [14]. In 2013, it was named Primate *Erythroparvovirus 1* and assigned to the *Parvoviridae* family, *Parvovirinae* subfamily and *Erythroparvovirus* genus at the congress of virologists in Edinburgh (Scotland). At the 2022 regular convention, its name was not changed [15].

Until 2005, only one species of the *Parvoviridae* family, *Parvovirinae* subfamily, *Erythroparvovirus* genus, *Primate erythroparvovirus 1*, was thought to be pathogenic to humans. However, in 2005 in Sweden, T. Allander described a new respiratory virus from the Parvovirus family, *Bocaparvovirus* genus, called human bocavirus (species HBoV1). It was isolated from infants and children suffering from acute respiratory diseases of the upper and lower respiratory tract by molecular viral screening based on cloning and bioinformatics analysis [16, 17]. This pathogen is the fourth most common virus detected in respiratory samples after adenoviruses, rhinoviruses, and respiratory syncytial

**Table 1.** The taxonomic position of human B19 parvovirus

Year	Source	Family — subfamily — genus — species
1991	ICTV 5 <sup>th</sup> Report	Parvoviridae — ... — Parvovirus — B19 virus
1993	Plenary session vote 10 August 1993 in Glasgow	<i>Parvoviridae</i> — <i>Parvovirinae</i> — <i>Erythrovirus</i> — B19 virus
2005	ICTV 8 <sup>th</sup> Report	<i>Parvoviridae</i> — <i>Parvovirinae</i> — <i>Erythrovirus</i> — <i>Human parvovirus B19</i>
2013	EC 45, Edinburgh, July 2013; Email ratification 2014	<i>Parvoviridae</i> — <i>Parvovirinae</i> — <i>Erythroparvovirus</i> —
2022	EC 54, July 2022; Email ratification 2023	<i>Primate erythroparvovirus 1</i>

virus (it is the cause of acute respiratory viral diseases in children and adolescents in 9–20% of cases) [18–20].

### State of the level of population immunity in conditionally healthy individuals

PVI is quite widespread worldwide and causes a wide range of clinical manifestations. A meta-analysis of plasma from 93,636 healthy donor individuals from 17 countries between 1993 and 2019 showed a prevalence of IgG markers at 50.1% (95% CI 43.1–57.1%) and IgM markers at 2.2% (95% CI 1.3–3.7%) [21].

The serologic marker of past infection is the presence of B19V-specific IgG antibodies (previous infection), while IgM antibodies to B19V are the marker of acute PVI infection. There is lifelong immunity after a previous PVI infection. Infection with B19V usually occurs during childhood and adolescence (5–15 years of age). However, adults who are not immune to PVI are also involved in the epidemic process. The prevalence of B19V-specific IgG antibodies in the population depends on age: 2–20% in children under 5 years of age, 15–40% in children aged 5–18 years, and 40–80% in adults [22–24].

However, the seroprevalence of PVI markers differs in different regions of the CIS countries. Thus, when assessing the state of specific immunity in different age groups of the Moscow population in 2015, it was shown that the proportion of seropositive results increased from 25% in children 1–2 years of age

to 56.3% in the age group of 30 years and older [22]. At the same time, residents of the Republic of Belarus showed low seroprevalence in pediatric age groups (0–2 years — 8.8%; 3–4 years — 11.8%) and a higher level of seropositive individuals in the age group of 40–44 years (85.4%) [25].

Assessment of the prevalence of population immunity against PVI among conditionally healthy individuals in Russia and abroad (**Table 2**) confirms the ubiquitous nature of the infection. The obtained data testify to active circulation of B19V, rather wide prevalence of PVI (the frequency of occurrence of the PVI marker amounted to 47.4–66.0%) among conditionally healthy individuals. At the same time, the presence of B19V seronegative individuals in all age groups creates conditions for the spread of infection, including in risk groups (blood donors, hematological patients, pregnant women, individuals from organized groups).

### B19V seroprevalence and viral load in blood donors

Viral safety in transfusion of blood and its components is one of the most important problems of transfusiology [31–33]. Modern achievements and scientific discoveries in the field of medicine, development of transplantology, improvement of medical care for the population and increase in invasive interventions — all this has significantly increased the need of therapeutic and preventive medical organizations in blood pro-

**Table 2.** The frequency of anti-B19V IgG antibodies detection among conditionally healthy of individuals in different countries

Country	Number of persons surveyed	Of these, having IgG-antibodies		Year of publication	Source
		abs.	%		
Russia (St. Peterburg)	317	197	62,1	2020	[24]
Russia	200	123	66,0	2019	[25]
Belarus	942	482	51,2	2014	[23]
Uzbekistan	650	402	61,9	2019	[26]
Tadjikistan	114	54	47,4	2020	[24]
Kazakhstan	480	313	65,2	2020	[24]
Serbia	552	339	59,6	2020	[24]
Guinea	321	173	53,9	2020	[24]
Croatia	1538	986	64,1	2021	[25]

ducts. According to the requirements of domestic regulatory documents, their production is supposed to use raw materials free of viruses or with minimal viral load [34]. Meanwhile, according to domestic and foreign sources, this infection is relevant for such an important contingent of people as blood donors and blood components, since PVI, being a blood borne transmissible agent, is transmitted to recipients — hematological patients and immunocompromised persons [35]. Despite ongoing discussions on the feasibility of donor screening, the European Pharmacopoeia and the US Food and Drug Administration recommend testing donor blood for B19V along with blood borne infections (HIV, hepatitis B, C, D, etc.) [32].

When studying the pathogenesis of PVI, it was found that B19V has tropism to red blood cell precursor cells [36], which often leads to a life-threatening complication, aplastic crisis, in patients with various forms of hemolytic anemia. It has been established that the overwhelming majority of cases of this pathology are caused by B19V [9, 37].

To determine the frequency of occurrence of PVI markers among donors in a number of regions of our country in recent years, screening of varying degrees of scale has been carried out. Thus, during the study of blood serum from 1000 donors in Nizhny Novgorod region, the authors identified 10 (1%) samples that contained B19V DNA with a viral load of  $10^3$ – $10^6$  copies/mL. IgM was detected in 1 sample. All DNA-positive samples contained IgG antibodies (DNA-negative samples contained IgG antibodies in 29.7%), representing 30.7% of the total number of donors [38].

In a study to determine the occurrence of B19V in donor populations, 510 people (Grozny) and 1011 people (Moscow) were examined [32]. Donors from the Chechen Republic had 7 samples positive for B19V DNA with a viral load of 103 copies/mL or less (1.3%). The second group had 20 (1.9%) positive samples for B19V DNA, of which 8 (0.8%) had a viral load of 104 copies/mL or higher.

A large-scale study of donor plasma used in the industrial production of blood products was conducted in the Kirov region. As a result of the study of several tens of thousands of samples, it was found that 0.003% of donors had a B19V DNA concentration of 106 copies/mL or higher [33], which, can lead to contamination of the entire volume of plasma when pooled.

To evaluate specific humoral immunity, we studied 500 donor plasma samples. It was found that 426 (85.2%) had IgG. Of these samples, PCR detected viral load in 74 (17.4%), and in 12 (2.4%) it exceeded 104 copies/mL.

Thus, even the few studies of donor blood conducted in our country correlate with the data of studies conducted in other countries and show the presence of viral DNA in blood plasma, which indicates the acuteness of the latent epidemic process, and a significant vi-

ral load determines the epidemiologic danger of blood products.

A survey of 93,636 blood donors was conducted in 17 countries from 1993 to 2019. According to a random effects model, the pool of B19V DNA prevalence was 0.4% (95% CI 0.3–0.6%; I = 89.7%) [21]. **Table 3** shows the countries with a higher frequency of B19V DNA detection of 104 copies/mL or higher among blood donors.

The prevalence of B19V DNA among blood donors varies from country to country, which can be partly explained by the geographical location of the regions studied, seasonal variations, demographic characteristics, the purpose and sensitivity of the assay used, and the year in which the blood samples were collected (due to the cyclical nature of the epidemic).

Sufficient prevalence of B19V DNA in donor blood samples suggests the need to test donor blood for the amount of DNA of this pathogen in order to improve the epidemiologic safety of blood products and avoid samples with a virus concentration of 104 copies/mL or higher.

### Frequency of detection of PVI markers in pregnant women and its impact on the fetus

Another socially significant group that is subject to epidemiologic monitoring for PVI are pregnant women or those who are planning pregnancy. This is due to the increased risk of endogenous fetal damage and subsequent adverse events that may occur during pregnancy against the background of intrauterine infection with this pathogen. Workers of kindergartens and schools are most often exposed to infection. Kindergarten teachers have a 3-fold higher risk of developing acute PVI compared to other pregnant women, and school teachers have a 1.6-fold higher risk [44]. When a pregnant woman is infected with PVI, the risk of transmitting the virus to the fetus averages 17–33% [11, 45]. At the same time, the risk of transplacental infection of the fetus is 35–51% of cases [43, 46], the frequency of unfavorable pregnancy outcomes is 20–30%, and fetal death is 10–15% [47]; therefore, PVI is considered as a component of the TORCH complex [48]. According to WHO experts, the risk of fetal death when a woman is infected with B19V in the first 12 weeks of pregnancy, at 13–20 weeks and after 20 weeks is 19, 15 and 6%, respectively [49]. It should be noted that PVI is rarely recognized during pregnancy, as in most cases it is asymptomatic or occurs as a respiratory infection.

The mechanism of the pathogen's negative effect is related to the tissue tropism of the virus, which is capable of affecting placental cells, since the P-antigen (globoside), which is the main receptor for B19V, is located on the surfaces of trophoblast and chorionic villus cells [11]. Furthermore, specific inflammatory changes can lead to placental dysfunction and unfavorable pregnancy outcome even in the absence of fetal infection.

**Table 3.** The frequency of B19V DNA detection in blood donors in different countries

Country	Number of donors surveyed	Of these having DNA B19V 10 <sup>4</sup> copies/ml and above		Year of publication	Source
		abs.	%		
Great Britain	1000	9	0,9	2004	[34]
Ghana	1000	13	1,3	2004	[34]
South Africa	360	2	0,6	2004	[34]
USA	5020	44	0,9	2007	[35]
China	3957	23	0,6	2011	[36]
Russia	1521	27	1,9	2012	[29]
Russia	500	12	2,4	2019	[29]
Iran	500	6	1,2	2018	[37]
Brazil	480	9	1,9	2019	[38]

In this case, the cause of intrauterine fetal death is placental insufficiency [50]. Against the background of erythropoiesis suppression, anemia is observed in the fetus and aplastic crisis may occur with subsequent hypoxia causing dysfunction of its various organs [51]. When viral myocarditis develops, cardiac rhythm disturbances occur, which may lead to fetal cardiac arrest and death [52]. The main clinical manifestation of congenital PVI is thought to be nonimmune fetal hydrocele, which develops in 80% of cases in the second trimester of pregnancy [53, 54]. Congenital PVI may also manifest with hepatosplenomegaly, sickle cell anemia, developmental delay and other pathological conditions [50].

Given the negative impact of B19V on the fetus, the screening of pregnant women in the I and II trimesters of pregnancy for markers of specific humoral immunity in is reasonable. In a number of foreign countries, this infection is referred to infections of the TORCH group, and therefore women planning pregnancy and pregnant women are examined for PVI. In our country, publications on this topic are rare and contradictory. To determine the risk of possible infection of women during pregnancy, the presence of markers of specific antiviral immunity, indicating acute (IgM antibodies) and past (IgG antibodies) PVI, is determined in blood plasma samples. The results of serologic examination of women and prediction of possible fetal complications are shown in **Table 4**.

Screening and monitoring of the serologic status of pregnant women can determine the course of action, the need for additional testing and preventive measures.

The prevalence of PVI markers among pregnant women in different regions of the world varies widely, which can be partly explained by the geographical location of the regions, natural factors, demographic characteristics and national traditions, the sensitivity of the assay used, and different manifestations of the cyclical nature of the epidemic process.

Determination of the prevalence of markers of specific antiviral immunity in the group of pregnant women in different countries shows that up to half of pregnant women (25–46%) are at risk of infection and transplacental transmission of this disease to the fetus (**Table 5**). The active spread of PVI among women of childbearing age indicates the risk of infection of women during pregnancy with the possibility of unfavorable outcomes and can lead to various complications, especially in the first trimester of pregnancy.

In order to prevent acute fetal PVI, the monitoring of the pregnant woman depends on the gestational age at which the infection occurred. In the first trimester, ultrasound (collar space screening, Doppler venous hemodynamics) is used to detect anemia. At up to 20 weeks of gestation, fetal screening should be started no later than 4 weeks after maternal illness or seroconversion. If the ultrasound shows fetal hydrocele, the woman should be warned of the possible consequences

**Table 4.** Results of serological examination of women and prediction of possible fetal complications

Result	Interpretation of the obtained data
IgG+, IgM–	A past infection (there is no risk to the fetus)
IgG+, IgM+	Infection during the last 7–120 days (possible risk to the fetus)
IgG–, IgM+	Acute infection (maximum risk to the fetus)
IgG–, IgM–	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

**Table 5.** IgG seroprevalence in pregnant women in different countries

Country	The number of women surveyed	Of them having IgG antibodies, %	Year of publication	Source
Tunisia	404	76,2	2011	[50]
Finland	558	58,6	2005	[51]
Jordan	439	51,3	2006	[52]
Netherlands	2567	70	2005	[53]
Italy	1893	69,5	2022	[54]
Russia	233	56,2	2019	[55]
Iran	1954	54	2016	[56]
Kuwait	1047	53,3	1999	[57]

of the disease. If no fetal abnormalities are detected, ultrasound examinations are continued at 1–2 week intervals. In the high-risk group, weekly Doppler examination of the middle cerebral artery, peak systolic blood flow velocity and venous duct blood flow is recommended [11].

It should be emphasized that due to the lack of available means of specific prophylaxis, the main attention should be focused on measures aimed at identifying non-immune pregnant women, preventing their infection and careful clinical and serological monitoring during pregnancy. All of this points to the necessity of introducing mandatory screening of pregnant women for the presence of PVI markers.

#### Frequency of detection of PVI markers in patients with exanthemic manifestations of the infectious process

Since 2002, a strategic plan for the elimination of endemic measles and rubella infection and prevention of congenital rubella infection has been implemented in Russia in accordance with the recommendations of the WHO Regional Office for Europe. The success achieved in reducing the incidence of these infections

has led to greater attention being paid to other diseases with exanthemic manifestations of the infectious process. The onset of exanthema usually occurs early in the disease and is the leading clinical symptom for differential diagnosis. One of these most common infections includes PVI. The main form of the disease is infectious erythema (fifth disease), which is registered in the International Classification of Diseases (ICD-10) under the code B08.3 [62].

Since the discovery of the virus, a large number of scientific studies have been conducted abroad to investigate the epidemiology, diagnosis, and clinical manifestations of PVI. In our country, studies have been conducted only since the beginning of the current century, and their number is clearly insufficient to determine the prevalence of PVI markers, especially in socially important groups.

However, some data on the prevalence of PVI among examined persons with exanthemic manifestations of the infectious process in some regions of our country and other countries have been obtained from available sources (**Table 6**).

The largest number of examined patients was in the Republic of Belarus, where the highest proportion

**Table 6.** The frequency of detection of anti-B19V IgM antibodies in patients with exanthemic manifestations of the infectious process

Country	The number of examined persons with exanthema	Of those with anti-B19V IgM antibodies, %	Year of publication	Source
Russia, Southern Federal District	184	8,2	2008	[58]
Russia, Northwestern Federal District	465	20,4	2012	[59]
Russia, Northwestern Federal District	336	14,9	2015	[59]
Belarus	4919	27,8	2021	[60, 61]
Argentina	141	14,9	2012	[62]
Russia	69	20,1	2019	[55]
Italy	390	5,1	2015	[63]
Iran	583	19,2	2016	[64]
Cuba	298	10,7	2019	[65]
Bulgaria	1266	22	2016	[66]

of acute PVI among all acute exanthemic diseases was detected. If we consider the age structure, it is dominated by children. IgM antibodies to B19V was detected in the age groups 4–6 years (22,5%) and 7–10 years (22,6%), which indicates that the main form of PVI disease in childhood is infectious erythema, and the least amount of acute PVI marker was determined in older age groups — 40–49 years (3,05%) and 50–64 years (1,6%).

To assess the frequency of IgM antibodies to B19V in the Northwestern Federal District before and after the adoption of restrictive measures due to the COVID-19 pandemic, the St. Petersburg Regional Center for Measles and Rubella Surveillance examined blood sera from its collection. IgM antibodies to B19V (a laboratory marker of acute PVI) were tested in 1695 samples from 11 territories of the district.

PVI was laboratory confirmed in 198 (11.7%) samples. For comparison: in 2012, the proportion of positive samples out of the number of samples tested was 20.4%, and in 2015, 14.9% (Table 6). On the territory of Russia, restrictive measures in connection with COVID-19 were introduced from 30.03.2020. In 2020, the proportion of positive samples with confirmed PVI was 8.9%; in 2021, it was 10.2%. In 2022, the social restrictions were completely removed. When serum samples from patients with fever and rash were examined, IgM antibodies to B19V were detected in 14.8% of cases. These studies show that the restrictive measures introduced in connection with the COVID-19 pandemic played a role, especially in reducing the incidence

of acute PVI, as well as other infections with aerosol transmission.

In conducting our own studies of patients with exanthemic manifestations of various diseases, 69 patients admitted to an infectious disease hospital in St. Petersburg were examined. The distribution of samples with detected IgM antibodies to B19V in the serum of patients with various exanthemic diseases is presented in **Table 7**.

According to the results of the study, it should be noted that in none of the cases were patients diagnosed with PVI. Thus, the problem of early diagnosis of PVI in patients admitted to an infectious disease hospital with exanthema syndrome is caused by objective difficulties associated with the diversity of manifestations in the clinical picture. In addition, insufficient knowledge of physicians of the main clinical syndromes characteristic of PVI, in the form of a relatively small proportion of this infection among other infectious diseases, plays an important role.

### Conclusion

The results of the literature review showed the presence of latent PVI epidemic process among different social groups in the population of many countries. The results suggest that in order to prevent blood borne infection with B19V, it is important to include B19V DNA testing and quantitation in the list of mandatory testing of donor blood in order to improve the epidemiologic safety of blood products and to reject samples with a virus concentration of 104 or more copies/mL.

**Table 7.** The proportion of laboratory-confirmed B19 PVI in different preliminary diagnoses

Preliminary clinical diagnosis	The number of serums, abs.	The number of anti-B19V IgM positive samples, abs.	The proportion of laboratory-confirmed PVI, %
<b>I class</b>			
Exanthema of unclear etiology	32	7	21,9
Infectious mononucleosis	6	2	33,3
HIV infection	1	0	0
Herpesvirus infection	1	1	100
Thrombocytopenia	2	0	0
Toxicoderma	4	0	0
Fever of unknown origin	2	0	0
Pseudotuberculosis	1	0	0
Total	49	10	20,4
<b>X class</b>			
Acute respiratory viral infections of the upper respiratory tract	14	1	7,1
Tonsillitis	2	1	50,0
Bronchitis	2	1	50,
Pneumonia	2	1	50,0
Total	20	4	20,0
In total	69	14	20,3

B19V poses a potential risk to pregnant women. The risk of infection of pregnant women, the possibility of transplacental transmission with the possibility of severe congenital disease is quite high. In our country there are no accurate data on the frequency of PVI among women of childbearing age, the frequency of congenital infection. Therefore, all pregnant women and women planning pregnancy should be screened for PVI markers regardless of age and number of pregnancies. Immunologic screening of pregnant women at risk will not only allow timely detection of PVI, but will also help to reduce the development of pregnancy pathology and fetal deaths. The acute form of PVI is common among infectious diseases with exanthemic manifestations and in respiratory diseases with atypical course. However, the final diagnosis of PVI can be made only on the basis of the results of laboratory tests. In this regard, patients with exanthema need to conduct laboratory tests to detect specific IgM-antibodies not only to measles and rubella viruses, but also to B19V for the differential diagnosis of exanthemic diseases.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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.
- 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>
- 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>
- 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/rqjzpo>
- 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)
- 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>
- 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>
- 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>
- 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)
- 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)
- 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>
- 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>
- 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.
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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](https://doi.org/10.4103/ajts.ajts_185_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>
- 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>
- 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>
- Ермолович М.А., Дронина А.М., Самойлович Е.О. Распространенность IgG-антител к парвовирусу В19 среди жите-

- лей 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 B19 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 B19 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 B19 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/qfkkfqr>
29. Попцов А.Л. *Значение индикации ДНК парвовируса B19 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/djfujuj>
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 B19 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 B19V 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/rvvvxo>
40. Wong A., Tan K.H., Tee C.S., Yeo G.S. Seroprevalence of cytomegalovirus, toxoplasma and parvovirus in pregnancy. *Singapore 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 B19 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 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/wtwfyk>
  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. Говорукина 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/wwylj>
  60. Ермолович М.А., Дронина А.М., Самойлович Е.О. Эпидемиологический процесс острой парвовирусной инфекции в Республике Беларусь. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016;(5):13–20. Ermolovich M.A., Dronina A.M., Samoilovich 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/xemfdx>
  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):1981–4.  
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>

### Information about the authors

*Oleg N. Nikishov*<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Med), Associate Professor, Department of general and military epidemiology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia, [nikishov.oleg2015@yandex.ru](mailto: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

### Информация об авторах

*Никишов Олег Николаевич*<sup>✉</sup> — к.м.н., доцент кафедры общей и военной эпидемиологии ВМА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, [nikishov.oleg2015@yandex.ru](mailto: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

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).

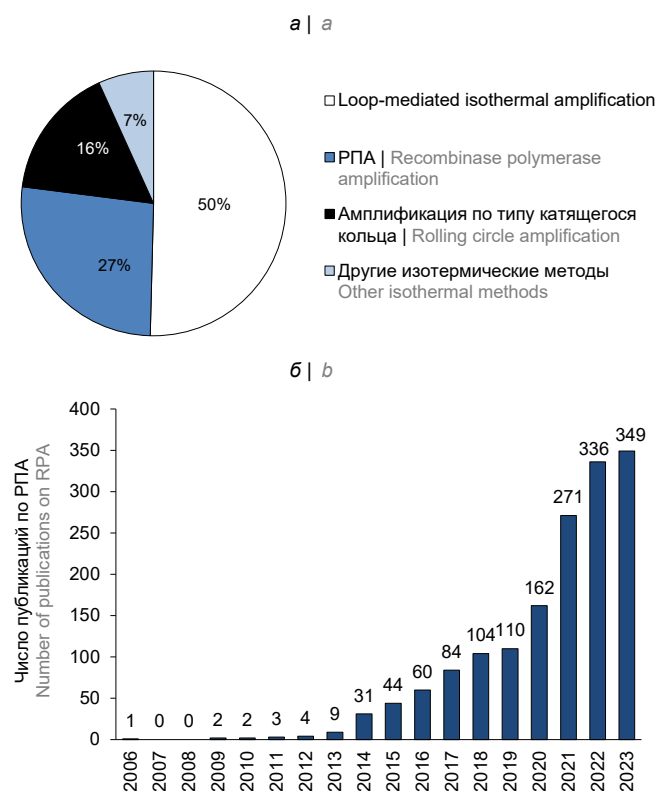
Метод РПА был предложен относительно недавно, в 2006 г., группой учёных под руководством N.A. Armes [1]. В последние годы отмечается ежегодный рост числа публикаций, посвящённых РПА (рис. 1, б), что свидетельствует об активном интересе к данной технологии.

**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.

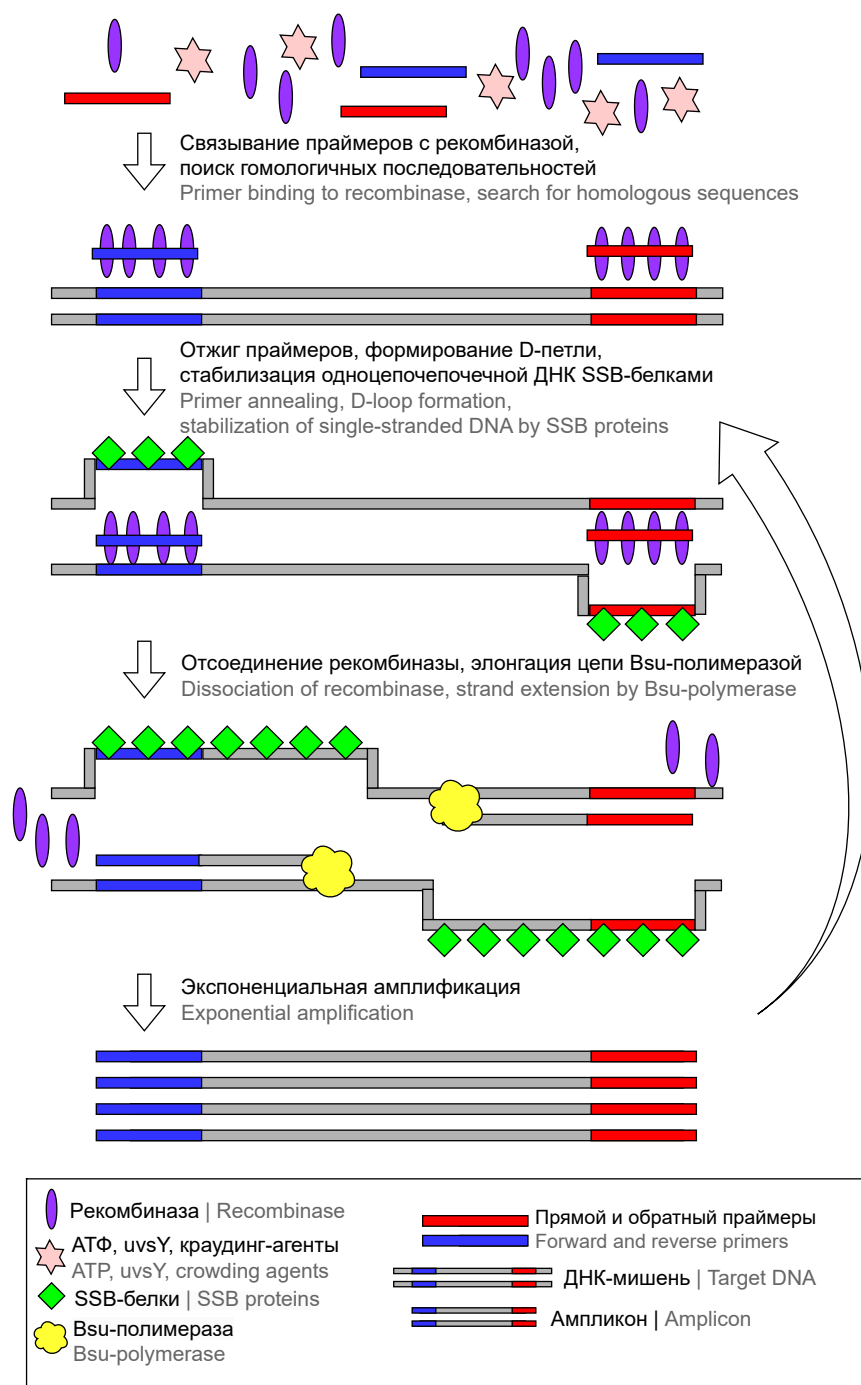


Рис. 2. Механизм РПА.

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].

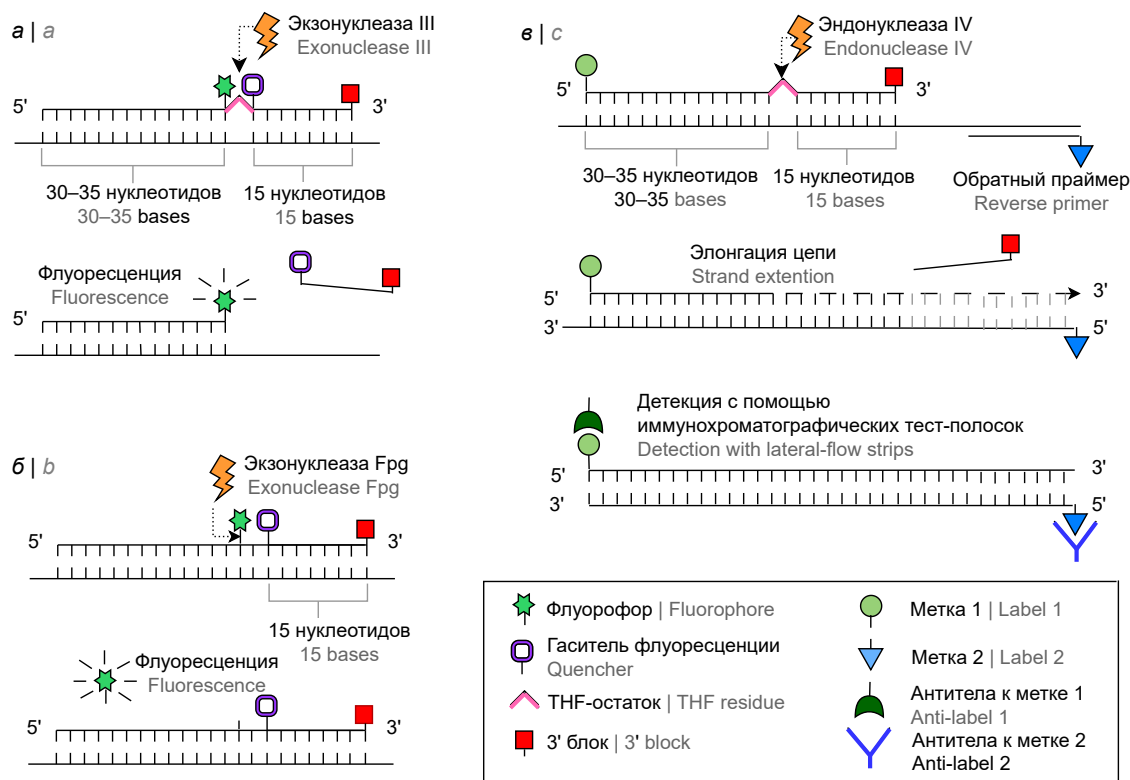
### Методы детекции

**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 —  $\mu$ 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  $\mu$ PADs, добавив новые точки с лиофилизированными на них праймерами ещё к 2 мишеням. При сопоставлении с ПЦР чувствительность технологии  $\mu$ 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](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. Рекомбинантная 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**<sup>✉</sup> — к.м.н., с.н.с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского НИПЧИ, Волгоград, Россия, [bondareva0s@mail.ru](mailto: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**<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, [bondareva0s@mail.ru](mailto: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



## Subgingival microbiome in periodontal disease and comorbid pathology (meta-analysis)

Tatyana V. Tsareva, Irina P. Balmasova, Viktor N. Tsarev<sup>✉</sup>

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>

Обзор  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-500>

## Поддесневой микробиом при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (метаанализ)

Царева Т.В., Балмасова И.П., Царев В.Н.<sup>✉</sup>

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>

## Introduction

Chronic generalized periodontitis (CP) is a severe lesion of the gums and underlying periodontal tissues with a recurrent course, which is the main cause of tooth loss in middle and old aged people. In terms of prevalence, this pathology is the leading dental problem in the world among able-bodied adults, although significant variations in frequency have been found depending on age, region, climatic and social conditions (frequency varies from 60 to 90%) [1–3]. The socio-medical significance of the problem of CP is constantly increasing, especially in connection with the growth of the disease of aggressive periodontitis developing at a young age [4, 5]. The problem of CP is actively discussed at various congresses held under the auspices of WHO due to the recognition of the fact that microbial damage of the periodontium is closely related to a number of systemic diseases and likely plays an important role in the occurrence of comorbid pathology [5–7].

The ability of microorganisms to colonize the oral mucosa, periodontal tissues and tooth surfaces with the formation of a multicomponent structured microbial biofilm is extremely important from a biological point of view. Bacteria perform numerous metabolic, barrier and protective functions, contribute to the integrity of periodontal tissues, increase the proliferation of epithelial cells, prepare the mucosal barrier to potential pathogen infiltration through the production of antimicrobial peptides and cytokines [6].

The key moment in the development of infectious-inflammatory lesions of periodontal tissues is the colonization of microbial biofilm by priority pathogens capable of intracellular parasitism and called periodontal pathogenic. The localization of this biofilm is in the area of the dento-gingival sulcus, and as the destructive process progresses, it is localized in the forming periodontal pocket [8, 9].

Thus, the topic at hand is the subgingival microbiome formed when the biofilm is colonized by both normal biotic and periodontal pathogenic bacterial species.

In 1998, S.S. Socransky et al. proposed a classification based on the study of the degree of frequency of identification of microflora representatives in the focus of inflammation: red, orange and other complexes, as well as to a greater extent representing normal and transient microflora — yellow, green and violet were identified. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (according to the old nomenclature — *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola* [10], in particular, are referred to the red complex. However, at present, this classification has more historical significance, since some pathogens of aggressive periodontitis, for example, toxigenic serotype *b* actinobacillus *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, were described somewhat later [11].

After the I Congress of Periodontologists of Russia in 2005, the concept of periodontal pathogenic bacteria of the first order was first introduced in the Russian literature, which possess a combination of three leading features: vertical and horizontal transmission of the infectious agent from person to person, the ability to intracellular parasitism, and toxicogenicity (primarily the production of exotoxins), in contrast to periodontal pathogens of the second order, which do not have a full set of these features. Three pathogens, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *A. actinomycetemcomitans*, toxigenic serotype *b*, were classified as periodontal pathogenic species of the I order [8, 9, 12]. In further studies, diagnostically significant microbial number indices for different species of periodontal pathogenic bacteria of I and II orders were established, which with certain adjustments are presented in **Table 1**.

In the development of periodontal diseases, synergistic and/or mutualistic interactions between oral pathogens (periodontal pathogens) are formed quite often, which are believed to contribute to the onset and progression of the disease. However, it should not be forgotten that such relationships are based on the potentiation of the action of their virulence factors as agents of the infectious process [6, 13]. While the etiologic role

**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]

Periodontal pathogen group	Group traits	Periodontal pathogen type	Quantity, CFU/ml
Periodontal pathogenic species of the I order	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 <sup>2</sup>
		<i>B. (Tannerella) forsythia</i>	> 10 <sup>2</sup>
		<i>P. gingivalis</i>	> 10 <sup>2</sup>
		<i>Prevotella intermedia</i>	> 10 <sup>2</sup>
		<i>Treponema denticola</i>	> 10 <sup>3</sup>
		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	> 10 <sup>3</sup>
		<i>Filifactor alocis</i>	> 10 <sup>3</sup>
		<i>Actinomyces israelii</i>	> 10 <sup>4</sup>
		<i>Parvimonas micros</i>	> 10 <sup>4</sup>
		<i>Streptococcus intermedius</i>	> 10 <sup>4</sup>
Periodontal pathogenic species of the II order	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>Eykenella corrodens</i>	> 10 <sup>3</sup>
		<i>Selenomonas</i> spp.	> 10 <sup>3</sup>
		<i>Wolinella recta</i>	> 10 <sup>3</sup>
		<i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i>	> 10 <sup>2</sup>

of *P. gingivalis* as a key periodontal pathogen is beyond doubt [14], the significance of some other hard-to-cultivate bacteria, which have begun to be studied according to modern molecular research methods, remains up to debate [15–17].

One of these microbes appears to be *F. alocis*, which has been relatively recently excluded from the *Fusobacteria* class, type *Firmicutes*, into a separate genus represented by a single species. As emphasized by E. Aja et al., *F. alocis* is a new member of the periodontal microbiome, and it is currently proposed to be used as a diagnostic indicator of periodontal diseases [18]. However, due to the lack of genetic tools to study this microorganism, until recently little is known about its characteristics and virulence, and its importance in comorbid pathology has been described in very few publications [19]. This circumstance prompted us, in recent studies, to create a diagnostic set of primers and probes for multiplex polymerase chain reaction (PCR) for the detection of this species of periodontal pathogenic bacteria [20, 21]. On the other hand, there is a clear need to analyze the available data on the composition and relationships of the components of the subgingival microbiome.

**The aim of** the meta-analysis was to characterize the composition of the subgingival microbiome and to determine the features of the formation of associations of the new periodontal pathogen *F. alocis* with other I and II order periodontal pathogenic bacteria, as well as with the commensal bacteria colonizing this biotope.

### Materials and methods

Searches were conducted in MEDLINE (via PubMed), EMBASE, and Cochrane Library databases from 2005 to October 2023 using keywords identified

in the study objectives using a search strategy that met the developed inclusion and exclusion criteria.

**Inclusion criteria:**

1) microbiome studies using bacterial 16S rRNA gene sequencing, including meta-analyses and systematic reviews that compared results obtained by microbiologic and molecular biologic methods (percentages of occurrence of bacterial types, genera, species) in subgingival plaque samples obtained:

- from systemically healthy patients without periodontal disease;
- from patients with CP without systemic pathology;
- from patients with CP with concomitant verified atherosclerosis (AT);
- from patients with CP with concomitant verified type 2 diabetes mellitus (T2D);

2) only studies indicating the detection of a relatively new difficult-to-cultivate periodontal pathogenic species, *F. alocis*, in the microbiome were taken into account.

**Exclusion criteria:**

- studies published in languages other than Russian or English;
- absence of primary data;
- absence of data on samples from the gingival sulcus of systemically healthy people in the groups of healthy people and/or from periodontal pockets with a depth of 5 mm or more in the groups of CP patients, including those with concomitant pathology;
- studies that evaluated only patients with gingivitis without signs of periodontitis, with aggressive or refractory periodontitis.



The search found a total of 1437 studies. After title screening, 1211 papers were excluded and 126 were screened. After reading the abstracts, 12 studies were excluded and 114 full-text publications were comprehensively evaluated. After reading these studies, 92 were excluded for not meeting the inclusion criteria. Thus, results from 22 literature sources were included in this study.

## Results

Once the appropriate array was obtained, data extraction was performed with the following additional information labeled:

- study location;
- characteristics of the participants (in terms of clinical periodontal condition and presence of comorbid pathology);
- type of microbiologic evaluation (study method);
- microbiologic results (in percentages) for individual bacterial taxa in different study groups.

Bacterial types, genera, species were subsequently indexed according to the taxonomic index of the US National Center for Biotechnology Information<sup>1</sup>.

The methodological features, year and place of research in the literature sources used for the meta-analysis are summarized and presented in **Table 2**.

Among the literature sources included in the study, there were 2 systematic reviews showing numerical data pooled from several sources, and the remaining sources contained the results of original studies. Quantitative data used in the meta-analysis were contained either as part of the graphical material or as supplementary information to the publication.

The generalized characteristics of the contingents of individuals analyzed from the original studies are presented in **Table 3**. The number of examined healthy individuals and patients suffering from CP was contained in 16 and 12 sources, respectively, and was quite significant (1529 and 2394 individuals). As for the groups of patients with CP associated with systemic pathological processes, only 6 sources containing data on the composition of the subgingival microbiome in 136 people with the association of CP and AT, and 6 sources based on the results of similar studies analyzing the data of 258 people with the association of CP and T2D met the search conditions.

The peculiarity of the comparative data contained in all 6 sources on the association of CP and AT is the study of not only the subgingival microbiome, but also the taxonomic composition of bacteria found in AT plaques of the vessel walls surgically removed in the process of providing both emergency and routine care to patients.

Thus, not only by metagenomic methods but also by PCR, it was found that first-order periodontal pathogenic bacteria belonging to the *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, and *T. forsythia* species were detected in more than 60% of samples obtained after *endarterioectomy* in Spanish patients [43]. However, PCR data of blood clots from Japanese patients with acute myocardial infarction showed that among periodontal pathogens, *A. actinomycetemcomitans* was the most common organism, detected in approximately 20% of samples [44].

Furthermore, AT plaques contained *Acinetobacter* (39%), *Chryseobacterium* (9%), *Rhizobium* (5%) and *Staphylococcus* (4%). Comparison of this microbiome with the subgingival microbiota showed that 22 bacterial genera were common to the two different loci, with *Acinetobacter* appearing to be the most prevalent [40].

In another study, bacterial DNA was detected in 12 endarteriectomy specimens (34.3%). Twenty-three bacterial species/phylotypes were identified. Proteobacteria and Firmicutes accounted for 78.3% and 21.7% of the identified taxa, respectively. However, 15 (60.9%) taxa belonged to bacteria not cultured on nutrient media. The periodontal pathogen *A. actinomycetemcomitans* was detected in 7 (20%) samples, followed by species from the *Pseudomonas* genus. Thus, the results suggest a role for the oral microbiota, particularly *A. actinomycetemcomitans*, in the development of inflammation during atherogenesis [45].

It is important to note that in no case the presence of representatives of *F. alocis* species in AT plaques was indicated; therefore, these data on the microbiome of AT plaques were not included in the ongoing meta-analysis.

### Comparative analysis of the taxonomic composition of the subgingival microbiome in the study groups

First of all, the ratio of the following bacteria belonging to different types was determined for comparative assessment of general trends of changes in the microbiome in groups of people with healthy periodontium, CP without systemic pathology, CP in association with AT or with T2D: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Synergistes*, *Spirochaetes*.

Comparative statistical analysis of the results was carried out by one-factor analysis of variance (One-way ANOVA) and was aimed at investigating the significance of the difference between the mean values taking into account the scatter (variance) of the data for each indicator. The Fisher's criterion (F) was used as a quantitative expression of such variance, and the probability (*p*) of its statistical significance was indicated.

As follows from the presented data, statistically significant differences in the percentage of individual types of bacteria in the microbiome, except for the taxonomic group TM7, were not found (**Table 4**) due to

<sup>1</sup> National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

**Table 2.** Information about the characteristics of the studies included in the meta-analysis

Study type	Country	Study group	n	Source
Original	USA	Healthy patients	15	[22]
		Patients with CP	15	
Original	USA	Healthy patients	29	[23]
		Patients with CP	29	
Original	USA	Healthy patients	5	[24]
		Patients with CP	2	
Original	USA, Chile	Healthy patients	10	[2]
		Patients with CP	22	
Systemic review	USA	Healthy patients	98	[25]
		Patients with CP	24	
Original	Brazil, Canada	Patients with CP and AT	18	[26]
Original	Brazil	Healthy patients	27	[27]
		Patients with CP	59	
Original	Brazil	Healthy patients	912	[28]
		Patients with CP	1918	
Original	Korea	Healthy patients	12	[29]
		Patients with CP	10	
Original	Russia	Patients with CP and AT	28	[30]
Original	USA	Healthy patients	76	[31]
		Patients with CP	76	
Original	USA, India	Healthy patients	75	[32]
		Patients with CP	50	
		Patients with CP and T2D	50	
Original	USA	Healthy patients	97	[33]
		Patients with CP and T2D	98	
Original	Brazil, USA	Healthy patients	98	[34]
Original	Mexico	Healthy patients	59	[35]
		Patients with CP	67	
		Patients with CP and T2D	38	
Original	Saudi Arabia	Healthy patients	19	[36]
		Patients with CP and T2D	15	
Original	South Africa	Healthy patients	32	[37]
		Patients with CP	32	
		Patients with CP and T2D	32	
Original	Russia	Healthy patients	16	[21]
		Patients with CP	15	
		Patients with CP and T2D	15	
Original	Tunisia	Healthy patients	10	[38]
		Patients with CP and AT	20	
Original	Italy	Healthy patients	15	[39]
		Patients with CP and AT	15	
Original	India	Patients with CP and AT	12	[40]
Original	Japan	Patients with CP and AT	43	[41]

**Note.** 16S rRNA genes were sequenced in all studies.

**Table 3.** Cumulative characteristics of the study population included in the meta-analysis

Analyzed attributes	Study groups			
	healthy patients	patients with CP	patients with CP and AT	patients with CP and T2D
<i>n</i>	1529	2394	136	258
Age, years	18–70	18–64	40–79	26–62
Sex, %	male	20–80	19–73	5–80
	female	20–80	27–81	20–95
Smokers, %	0–50	17–21	24–56	17–52
Depth of periodontal pockets, mm	< 3	≥ 5	≥ 5	≥ 5
Bleeding index, %	< 10	≥ 30	≥ 30	≥ 30
Glycosylated hemoglobin level, %	< 6%	< 6	< 7%	> 6,5

the high heterogeneity of the data. This conclusion also applies to the *Firmicutes* type, to which the main object of our attention belongs — the *F. alocis* species.

The results obtained in a comparative aspect concerned the percentage of individual bacteria of different genera in different study groups (**Fig. 1**).

Analysis of the obtained data shows that in all samples of the subgingival microbiome containing representatives of the *Filifactor* genus and included in this study, this genus was accompanied by another 70 genera of bacteria. In those cases, where the literature source had data on the species composition of the microbiome, the *Filifactor* genus included only one species — *F. alocis*, and the content of *Filifactor* genus bacteria was different in different study groups. Thus, in the group of healthy people the share of these bacteria (in %) among representatives of other species with the designation of median (minimum; maximum) was only 0.66 (0.1; 5.8); in the group of CP without systemic pathology — 3 (0.1; 13.0); in the association of CP + AT the index was also low — 0.12 (0.05; 0.27); and in the association of CP + T2D — significantly higher: 1.6 (1.0; 2.3).

Thus, *Filifactor* genus bacteria showed a relatively low content in the composition of the subgingival

microbiome in healthy subjects and in the association of CP + AT. In the association of CP + T2D, the median proportion of these bacteria in the periodontal microbiome was 2.4 times higher than in healthy subjects, and in patients with CP without systemic pathology — 4.5 times higher. Nevertheless, the scatter of data for each sample did not allow to establish statistically significant differences when comparing by One-way ANOVA: in the groups "healthy individuals - CP",  $F = 1.910$  at  $p = 0.192$ ; in the groups "healthy individuals — CP + AT",  $F = 0.427$  at  $p = 0.527$ ; in the groups "healthy individuals — CP + T2D",  $F = 0.002$  at  $p = 0.963$ .

Representatives of the following genera predominated in the subgingival microbiome of healthy people: *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Moraxella*, *Veillonella*; in patients with CP without systemic pathology — *Fusobacterium*, *Fretibacterium*, *Lachnoaerobaculum*, *Prevotella*, *Streptococcus*; in CP + AT — *Streptococcus*, *Veillonella*, *Propionibacterium*; in CP + T2D — *Prevotella*, *Streptococcus*, *Leptotrix*, *Veillonella*, *Actinomyces*.

All these data served as a basis for correlation analysis, which allowed us to determine possible relationships of bacteria of the genus *Filifactor* with other bacteria of the same localization.

**Table 4.** Representation of bacteria of each type in the subgingival microbiome by study group

Bacteria type	Bacterial representation in the microbiome, % (median (minimum; maximum))				One-way ANOVA	
	healthy patients	patients with CP	patients with CP and AT	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
TM7	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

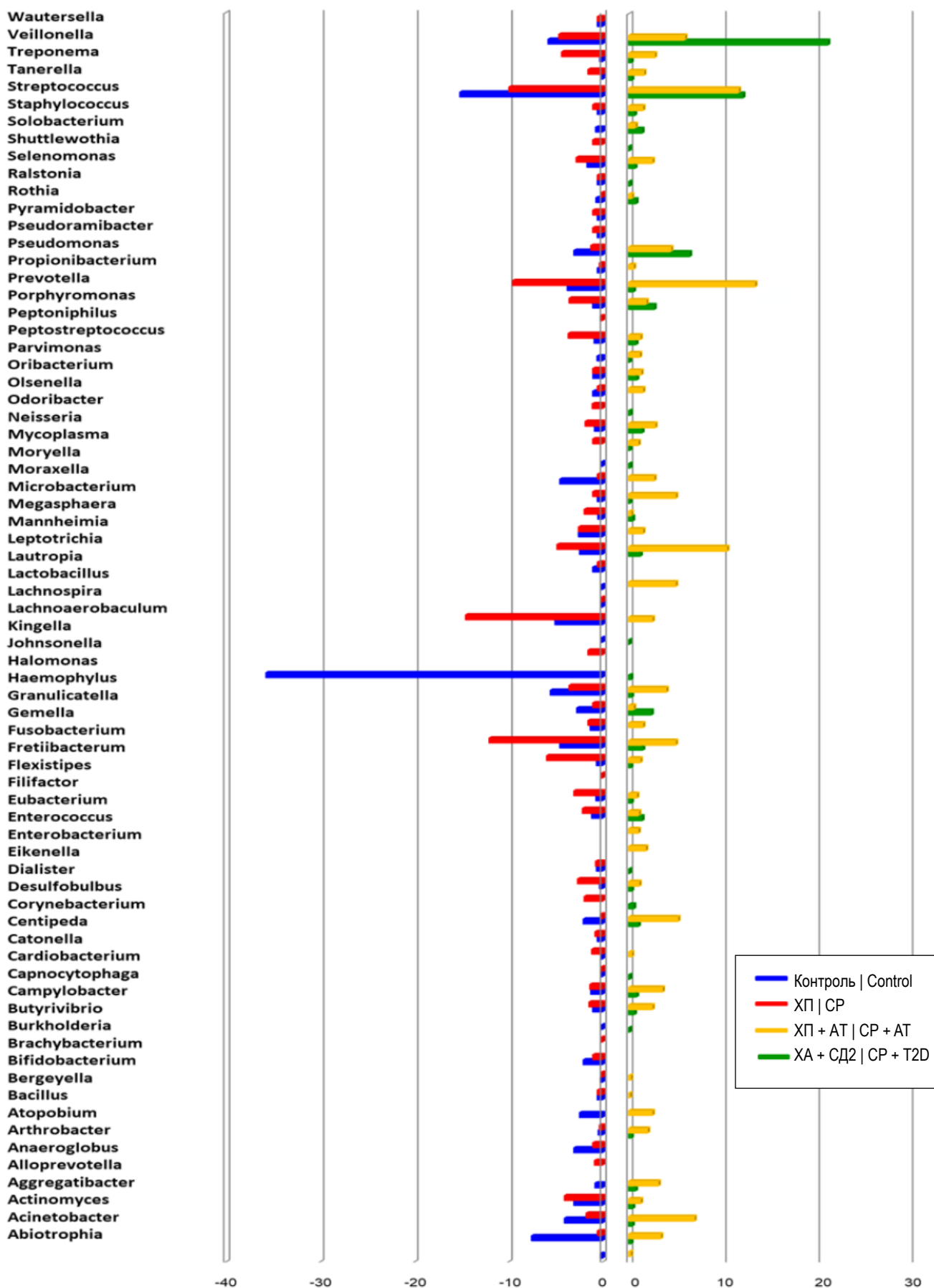


Fig. 1. Representation of the most frequent bacterial genera in the subgingival microbiome by study group.

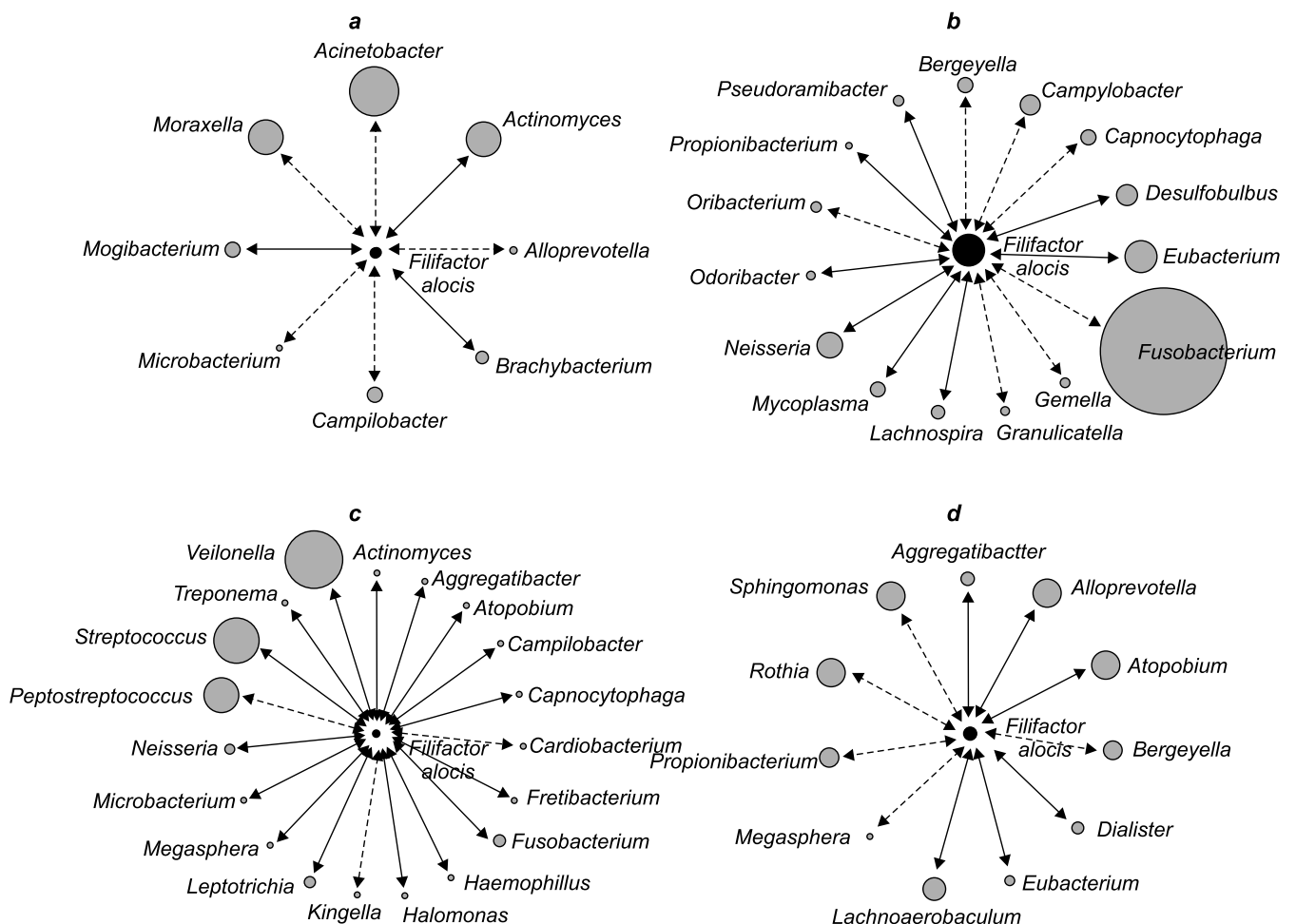
### Meta-analysis of correlations of bacteria of the genus *Filifactor* with other bacterial genera in the subgingival microbiome in the study groups

Correlation analysis of the data in the form of pairwise correlations was performed by determining the Spearman correlation coefficient ( $r$ ) and its statistical significance ( $p$ ) between bacteria of the genus *Filifactor* (species *F. alocis*) and other bacteria in the subgingival microbiome separately for each study group.

The content of bacteria of the genus *Filifactor*, represented by only one species of *F. alocis*, in the composition of the gingival sulcus microbiome of people with healthy periodontium was relatively small and was correlated at a statistically significant level with bacteria of 8 genera (Fig. 2, a). The correlations were positive with bacteria of the genera *Actinomyces*, *Brachy bacterium*, and *Mogibacterium*, which, like *Filifactor*, are Gram-positive microorganisms, while the correlations were negative with the other 5 genera (*Acinetobacter*, *Alloprevotella*, *Campylobacter*, *Misrobacterium*, and *Moraxella*).

The content of bacteria of *Filifactor* genus in complication of CP with such systemic disease as AT was minimal (Fig. 2, c). Nevertheless, the abundance of correlation pairs, the growth of the spectrum of microorganisms involved in them with a clear predominance of positive correlations draws attention. Such bacterial genera as *Aggregatibacter*, *Atopobium*, *Cardiobacterium*, *Fretibacterium*, *Haemophilus*, *Halomonas*, *Kingella*, *Megasphaera*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Veillonella* appear in the composition of correlation pairs, among which only 3 genera (*Atopobium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*) belong to Gram-positive microorganisms.

Fig. 2, d shows the range of correlations of *F. alocis*, whose abundance was about 10 times higher than in concomitant AT, with the bacterial genera included in the subgingival microbiome in CP associated with T2D. In the correlation analysis in this aspect, the number of pairwise correlations fell compared to the other pathological conditions analyzed to 11, with approximately the same ratio of positive to negative cor-



**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  $p < 0.05$ .

relations. Among positive correlations we can note the participation of Gram-negative bacteria of the genera *Aggregatibacter*, *Alloprevotella*, *Dialister*, and among Gram-positive bacteria — *Atopobium*, *Eubacterium*, *Lachnoanaerobaculum*.

## Discussion

Evaluating the results of correlation analysis, several features should be emphasized. In all groups, the content of *F. alocis* bacteria was different – from minimal in the association of CP and AT to maximum in CP without systemic effects. In the composition of correlation pairs there was not a single genus of bacteria that occurred in all 4 groups. The diagrams presented in our work indicate the existence of numerous correlations between *F. alocis* and other components of the microbiome, which, in combination with the data on the presence of its exotoxin, as well as *A. actinomycetemcomitans* [12], allows us to raise the question of its classification as a periodontal pathogenic species of the first order.

One of the foreign meta-analyses conducted within the framework of the international Human Microbiome Project showed that supra- and sub-gingival dental deposits (biofilm) are represented by 14 taxa of microorganisms, which are the most numerous both in terms of frequency of detection and quantitative expression in the composition of gingival biofilm: *Actinomyces*, *Aggregatibacter*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Wolinella* [6].

Based on the purpose of the meta-analysis presented in our article, special attention should be paid to those bacteria that appeared in the correlation pairs: either only in CP without systemic effects, only in the association of CP with both AT and T2D, only in AT or only in T2D. The species affiliation of the bacteria associated correlatively with *F. alocis* could not be determined because only a few of the selected literature sources contained this information, which was insufficient to identify statistically significant correlations. Only the first category of correlations (CP without systemic effects) with *Filifactor* genus bacteria included representatives of 8 genera: *Desulfobulbus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Lachnospira*, *Mycoplasma*, *Oribacter*, *Oribacterium*, *Pseudoramibacter*. Among the genera mentioned, there were no bacterial genera containing generally recognized periodontal pathogens. The second category associated with the manifestation of systemic effects of periodontal diseases included only 3 genera: *Aggregatibacter*, *Atopobium*, *Megasphaera*. Representatives of the *Aggregatibacter* genus, which was included in the composition of statistically significant correlation pairs, were registered in 58% of samples, and the other 2 genera — in 42%. In those sources that contained information on the species composition

of bacteria in the subgingival microbiome, bacteria of the genus *Aggregatibacter* included only one species — *A. actinomycetemcomitans*, which is classified as periodontal pathogen of the first order.

Only at AT correlation significant genera were registered: *Cardiobacterium*, *Fretibacterium*, *Haemophilus*, *Halomonas*, *Kingella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Veillonella*. Only at T2D, 4 genera were noted in the composition of correlative pairs: *Dialister*, *Lachnoanaerobaculum*, *Rothia*, *Sphingomonas*. In terms of species composition, where indicated, affiliation with periodontal pathogens was not noted in any case.

## Conclusion

1. A comparative meta-analysis of the subgingival microbiome under normal circumstances, in regular CP and CP associated with comorbid pathology, covering 1529 healthy and 2394 patients with CP was carried out, which allowed to obtain fundamentally new data confirming the differences of comparison groups in the composition of the microbiome. According to taxonomic characterization, representatives of the following genera prevailed in the composition of the subgingival microbiome of healthy people: *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Moraxella*, *Veillonella*; in patients with CP without systemic pathology — *Fusobacterium*, *Fretibacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Prevotella*, *Streptococcus*; in CP in association with AT — *Streptococcus*, *Veillonella*, *Propionibacterium*; in CP in association with T2D — *Prevotella*, *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Actinomyces*.

2. As a result of the meta-analysis of the data on the genus of bacteria that are correlated with *Filifactor* genus bacteria, which in those cases when the sources contained information on the species composition of bacteria, belonged to the *F. alocis* genus, it was found that the development of CP, conditionally not associated with systemic pathology, did not allow to determine significant correlations of these bacteria with other periodontal pathogens. At the same time, the place of *F. alocis* as a periodontal pathogenic species (probably of the first order) was clarified, since it is practically not found in the normal microbiota, indicating its relatively high virulence.

3. In groups of patients in whom CP was accompanied by the presence of systemic pathology — AT or T2D, in addition to associates-commensals, the presence of statistically significant correlations with the genus of *Aggregatibacter* bacteria containing periodontal pathogenic species of the first order — *A. actinomycetemcomitans* was confirmed. Representatives of the *Porphyromonas* (*P. gingivalis*) and *Tannerella* (*T. forsythia*) genera seem to be of independent importance as periodontal pathogenic species of the first order, due to their high virulence properties, regardless of symbionts from other taxa of the subgingival microbiome.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Кузьмина Э.М., Янушевич О.О., Кузьмина И.Н. *Стоматологическая заболеваемость населения России. Эпидемиологическое стоматологическое обследование*. 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. Микрoэкология 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>
- 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>
- 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](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_84_19)
- 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>
- Ahmed H.J., Svensson J.A., Cope L.D., et al. Prevalence of cdtABC genes encoding cytolethal-distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycescomitans* strains. *J. Med. Microbiol.* 2001;50(10):860–4. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-10-860>
- Ozuna H., Snider I., Belibasakis G.N., et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Filifactor alocis*: Two exotoxin-producing oral pathogens. *Front. Health.* 2022;3:981343. DOI: <https://doi.org/10.3389/froh.2022.981343>
- 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.
- 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.
- 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](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_288_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>
- 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>
- 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>
- Царева Т.В., Янушевич О.О., Царев В.Н., Балмасова И.П. Бактерии рода *Filifactor* у больных пародонтитом и сахарным диабетом по данным метагеномного анализа микробиома пародонта. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):485–94. 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/yqoxhk>
- 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/djlfzfu>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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. DOI: <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., Gtiff 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>



**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*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of microbiology, virology, immunology, Russian University of Medicine, Moscow, Russia, [nikola777@rambler.ru](mailto: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

**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*<sup>✉</sup> — д.м.н., профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии Российского университета медицины, Москва, Россия, [nikola777@rambler.ru](mailto: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

## 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*