

3

МАЙ—ИЮНЬ

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

3

MAY — JUNE

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.

3

МАЙ – ИЮНЬ

**ТОМ 101
2024**

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

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

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

DOI prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

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

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

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

**Журнал представлен
в международных базах данных
и информационно-справочных
системах:**

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

ПОДПИСКА:

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

**Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:**

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

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru

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

ИЗДАТЕЛЬ:

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

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

Журнал размещает рекламу в соответствии
с ФЗ РФ от 13.03.2006 № 38-ФЗ
«О рекламе» и рекламной политикой.

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

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

Подписано в печать 29.06.2024.
Формат 60×90^{1/8}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместители главного редактора

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

Ответственные секретари

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2024

FOUNDERS:
Central Research Institute for Epidemiology
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

JOURNAL
of MICROBIOLOGY,
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY
(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases.

The interdisciplinary approach enables the reader to integrate advanced scientific knowledge of related specialties, to receive a broad vision of the problems of fundamental and applied infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical technologies.

The Journal welcomes Russian and foreign original research articles, reviews, brief reports, mini-reviews, opinions and other special featured articles as well as lectures, methodological materials related to its profile.

The Journal is indexed in the SCOPUS database and admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science:

1.5.10. Virology (medical and biological sciences);

1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);

3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);

3.2.7. Clinical immunology, Allergology (medical and sciences).

In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a publication included in the SCOPUS and RSCI databases.

3

MAY–JUNE

VOLUME 101

2024

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

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

DOI prefix: 10.36233

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

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

The CrossMark service is used.

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

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

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

Index for subscription to the printed version of the journal:

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

Full texts of issues of the journal are available:

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

FOUNDERS:

Central Research Institute for Epidemiology
www.crie.ru

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

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on June 29, 2024.

Print format 60×90^{1/8}.

Circulation 158 copies.

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

Deputy Editors

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

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

Executive Secretaries

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

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

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, D. 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, D. Sci. (Medicine), Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

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

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

Alexander N. Lukashov, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Martsinovskiy 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, D. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, D. 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, D. Sci. (Medicine), Professor, Academician 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, D. Sci. (Medicine), 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, D. Sci. (Biology), Professor, Head, Laboratory of molecular epidemiology of viral hepatitis Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Elena R. Meskina, D. 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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кулешов К.В., Павлова А.С., Кремлева А.А., Карпенко А.Е., Михайлова Ю.В., Крутова Н.Е., Лисицына М.Р., Попова К.Р., Веселова О.А., Подколзин А.Т., Акимкин В.Г. Геномное разнообразие и анализ детерминант резистентности <i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Kentucky, изолированных в России*	303
Лобзин Ю.В., Ермоленко К.Д., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Мартенс Э.А., Полев Д.Е., Ермоленко Е.И. Кампилобактериоз: генотипическая характеристика возбудителя и иммунологический статус пациентов*	315
Соминина А.А., Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Мусаева Т.Д., Столяров К.А., Афанасьева О.И., Тимонина В.С., Венев Е.В., Леванюк Т.П., Смородинова Е.А., Курская О.Г., Шестопалов А.М., Леленкова Е.В., Семенов А.В., Лиознов Д.А. Изменения этиологической структуры тяжёлых острых респираторных вирусных инфекций у детей и взрослых под влиянием пандемии COVID-19*	327
Вязовая А.А., Соловьева Н.С., Герасимова А.А., Журавлев В.Ю., Мокроусов И.В. Молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов <i>Mycobacterium tuberculosis</i> от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России*	342
Селиванова С.Г., Зверев В.В., Пономарева Н.В., Леонов А.В., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Полянина А.В., Новикова Н.А. Обнаружение и типовая идентификация неполиомиелитных энтеровирусов у детей на фоне острых кишечных инфекций различной этиологии: 2018–2023 гг.*	351
Печковский Г.А., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Шапаков Н.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Тимченко Л.Д., Куличенко А.Н. Разработка методики молекулярного типирования штаммов <i>Bacillus anthracis</i> с использованием новых VNTR- и INDEL-маркеров*	362
Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л. Влияние <i>Yersinia pestis</i> с различным плазмидным составом на мембрану эритроцитов в крови морских свинок	372
Курашова С.С., Егорова М.С., Ветрова А.Н., Баловнева М.В., Попова Ю.В., Теодорович Р.Д., Мироненко А.А., Апарин П.Г., Львов В.Л., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Влияние углеводных адъювантов в составе экспериментального хантавирусного вакцинного препарата на динамику нейтрализующих антител в сыворотках крови морских свинок	383
ОБЗОРЫ	
Брусина Е.Б. Микробиом больничной среды*	393
Онищенко Г.Г., Кириллов И.А., Борисевич С.В., Сизикова Т.Е., Кротков В.Т. Анализ аэриобиологических исследований с ортопоксвирусами, проводимых Министерством обороны США*	399
Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н., Сегал О.Л., Печелюлько А.А., Яковлева Д.А., Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д. Технология получения моноклональных антител. 50 лет развития	412
ЮБИЛЕИ	
К 70-летию профессора Мурада Киясовича Мамедова	428

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Kuleshov K.V., Pavlova A.S., Kremleva A.A., Karpenko A.E., Mikhaylova Yu.V., Krutova N.E., Lisitsyna M.R., Popova K.R., Veselova O.A., Podkolzin A.T., Akimkin V.G. Genomic diversity and analysis of resistance determinants of <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar Kentucky isolated in Russia*	303
Lobzin Yu.V., Ermolenko K.D., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Martens E.A., Polev D.E., Ermolenko E.I. Campylobacteriosis: genotypic characteristics of the pathogen and immunological status of patients*	315
Sominina A.A., Danilenko D.M., Komissarov A.B., Pisareva M.M., Musaeva T.D., Stolyarov K.A., Afanasyeva O.I., Timonina V.S., Venev E.V., Levanyuk T.P., Smorodintseva E.A., Kurskaya O.G., Shestopalov A.M., Lelenkova E.V., Semenov A.V., Lioznov D.A. Changes in the etiological structure of severe acute respiratory viral infections in children and adults under the influence of the COVID-19 pandemic*	327
Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Gerasimova A.A., Zhuravlev V.Yu., Mokrousov I.V. Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of Russia*	342
Selivanova S.G., Zverev V.V., Ponomareva N.V., Leonov A.V., Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Polyamina A.V., Novikova N.A. Detection and type identification of non-polio enteroviruses in children against the background of acute intestinal infections of various etiologies: 2018–2023*	351
Pechkovskii G.A., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Shapakov N.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Timchenko L.D., Kulichenko A.N. Development of a technique for molecular typing of <i>Bacillus anthracis</i> strains using new VNTR and INDEL markers*	362
Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L. Influence of <i>Yersinia pestis</i> with different plasmid composition on the erythrocyte membrane in the blood of guinea pigs.	372
Kurashova S.S., Egorova M.S., Vetrova A.N., Balovneva M.V., Popova Yu.V., Teodorovich R.D., Mironenko A.A., Aparin P.G., Lvov V.L., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. The effect of carbohydrate adjuvants in the composition of the experimental hantavirus vaccine on the dynamics of neutralizing antibodies in the blood sera of guinea pigs	383
REVIEWS	
Brusina E.B. Hospital environment microbiome*	393
Onishchenko G.G., Kirillov I.A., Borisevich S.V., Sizikova T.E., Krotkov V.T. Analysis of aerobiological studies with orthopoxviruses by U.S. Department of Defense*	399
Massino Yu.S., Tarakanova Yu.N., Segal O.L., Pechelyulko A.A., Yakovleva D.A., Lichutina M.V., Dmitriev D.A., Dmitriev A.D. Monoclonal antibody techniques. 50 years of development.....	412
ANNIVERSARIES	
On the occasion of the 70 th anniversary of the Professor Murad Giyas oglu Mammadov.....	428



Геномное разнообразие и анализ детерминант резистентности *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Kentucky, изолированных в России

Кулешов К.В.¹, Павлова А.С.¹, Кремлева А.А.², Карпенко А.Е.¹, Михайлова Ю.В.¹, Крутова Н.Е.¹, Лисицына М.Р.¹, Попова К.Р.¹, Веселова О.А.¹, Подколзин А.Т.¹, Акимкин В.Г.¹

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

²Федеральный центр охраны здоровья животных, Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Salmonella Kentucky* сиквенс-типа ST198 относится к одному из эпидемиологически значимых клонов нетифоидных сальмонелл во всём мире и характеризуется наличием высокорезистентных штаммов, а также возможностью адаптации к различным животным-хозяевам и условиям окружающей среды.

Цель работы — исследование штаммов *S. Kentucky*, выделенных из различных источников на территории России, в аспекте их филогенетического положения в масштабах глобального разнообразия патогена и определение их генетических особенностей.

Материалы и методы. Методом полногеномного секвенирования исследовано 55 штаммов *S. Kentucky*, которые были изолированы в 2010–2022 гг. из различных источников (клинические штаммы, пищевые продукты, а также от животных, кормов и объектов окружающей среды). Полногеномное секвенирование проводили с использованием платформ «Illumina». Филогенетический анализ на основе анализа нуклеотидных вариаций, дополнительно включал 390 штаммов *S. Kentucky*.

Результаты. Большая часть российских штаммов ($n = 50$) относилась к ST198, 4 штамма — к ST314, 1 штамм — к ST152. Из 50 российских штаммов ST198 44 принадлежали к международной монофилитической MDR-линии *S. Kentucky* ST198 и относились к 4 отдельным сублиниям, 6 штаммов занимали базальное положение по отношению к MDR-линии. Всего было выявлено 320 генов и мутаций, ответственных за резистентность к противомикробным препаратам. Наиболее часто встречались точечные мутации в области QRDR. В большинстве случаев для российских штаммов было характерно присутствие вариантов геномного острова SGI1-K. При этом гипотетическая структура SGI1 соотносилась с филогенетической кластеризацией сублиний *S. Kentucky*.

Выводы. Результаты исследования позволили оценить популяционную структуру российских штаммов *S. Kentucky* ST198 в мировом масштабе и определить генетические детерминанты антибиотикорезистентности, включая структуру геномного острова SGI1.

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, *Salmonella Kentucky*, ST198, SGI1, антибиотикорезистентность, полногеномное секвенирование

Источник финансирования. Исследование проведено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021–2025 гг. (№ НИОКТР АААА-А21-121011990054-5).

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

Для цитирования: Кулешов К.В., Павлова А.С., Кремлева А.А., Карпенко А.Е., Михайлова Ю.В., Крутова Н.Е., Лисицына М.Р., Попова К.Р., Веселова О.А., Подколзин А.Т., Акимкин В.Г. Геномное разнообразие и анализ детерминант резистентности *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Kentucky, изолированных в России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):303–314.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-488>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-488>

Genomic diversity and analysis of resistance determinants of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Kentucky isolated in Russia

Konstantin V. Kuleshov¹✉, Anastasia S. Pavlova¹, Anna A. Kremleva², Anna E. Karpenko¹, Yuliya V. Mikhaylova¹, Natalia E. Krutova¹, Maria R. Lisitsyna¹, Kristina R. Popova¹, Olga A. Veselova¹, Alexandr T. Podkolzin¹, Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia;

²Federal Center for Animal Health, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Salmonella* Kentucky sequence type ST198 is one of the epidemiologically significant non-typhoidal *Salmonella* clones worldwide and is characterized by the presence of highly resistant strains and the ability to adapt to different animal hosts and environmental conditions.

The aim of this study was to analyze *S. Kentucky* strains isolated from various sources in Russia in terms of their phylogenetic position within the global diversity of the pathogen and their genetic characteristics.

Materials and methods. We examined 55 strains of *S. Kentucky* by whole-genome sequencing, which were isolated from 2010 to 2022 from various sources (clinical strains, food, as well as from farm animals, feed and environmental samples). Whole genome sequencing was performed using Illumina platforms. Phylogenetic analysis based on nucleotide variation analysis included an additional 390 *S. Kentucky* strains.

Results. Most of the Russian strains ($n = 50$) belonged to the ST198 sequence type, four strains were ST314 and one strain was ST152. Of the 50 Russian sequence-type ST198 strains, 44 belonged to the international monophyletic MDR lineage *S. Kentucky* ST198, and belonged to four separate sublineages, six strains occupying a basal position in relation to the MDR lineage. A total of 320 genes and mutations responsible for resistance to antimicrobial agents were identified. The most common were point mutations in the QRDR region. In most cases, Russian strains were characterized by the presence of variants of the SGI1-K genomic island. Moreover, the putative structure of SGI1 was correlated with the phylogenetic clustering of *S. Kentucky* sublineages.

Conclusions. The results of the study made it possible to assess the population structure of Russian *S. Kentucky* ST198 strains on a global scale and determine the genetic determinants of antibiotic resistance, including the structure of the SGI1 genomic island.

Keywords: *Salmonella enterica*, *Salmonella Kentucky*, ST198, SGI1, antibiotic resistance, whole genome sequencing

Funding source. The study was conducted as part of the industry research program of Rospotrebnadzor for the period 2021–2025. (№ НИОКТР АААА-А21-121011990054-5).

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

For citation: Kuleshov K.V., Pavlova A.S., Kremleva A.A., Karpenko A.E., Mikhaylova Yu.V., Krutova N.E., Lisitsyna M.R., Popova K.R., Veselova O.A., Podkolzin A.T., Akimkin V.G. Genomic diversity and analysis of resistance determinants of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Kentucky isolated in Russia. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):303–314.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-488>

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

Введение

Одним из эпидемиологически значимых сероваров нетифоидных сальмонелл является *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Kentucky (далее *S. Kentucky*). В ряде исследований описаны случаи изоляции штаммов, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), а в некоторых случаях даже устойчивых к карбапенемам. *S. Kentucky* считается одним из целевых сероваров для мониторинга распространённости в птицеводстве [1].

Различные исследования последних лет проливают свет на возникновение, движущие силы и потенциальные угрозы серовара *S. Kentucky*, в частности, сиквенс-типа (ST) *S. Kentucky* ST198, который легко адаптируется к давлению отбора, оказываемому применением антибиотиков в различных условиях окружающей среды. Этот серовар сальмонелл эволюционировал от отсутствия устойчивости до 1990 г. к увеличению распространённости устойчивых к ципрофлоксацину изолятов в начале XXI в. (с 55% в 2007 г. до 88% в 2017 г. [2, 3]). В первые

годы этого десятилетия в исследованиях регистрируют накопление генетических элементов, ответственных за устойчивость к широкому спектру противомикробных препаратов [2]. Интенсивное использование антибиотиков в животноводстве и медицине является одной из первостепенных причин этого явления. Глобализация торговли и возможности для путешествий создают благоприятные условия для распространения устойчивых бактериальных клонов на международном уровне. В Европе инфицирование людей штаммом *S. Kentucky ST198* с множественной лекарственной устойчивостью (Multiple drug resistance, MDR) раньше главным образом ассоциировалось с поездками в Северную Африку или Юго-Восточную Азию, причём наиболее вероятным источником этих бактериальных изолятов указывался преимущественно Египет [2, 4, 5].

Показано, что все MDR-штаммы *S. Kentucky ST198* принадлежат к одной генетической линии, накопившей детерминанты устойчивости к противомикробным препаратам с начала 1990-х гг. [5]. Различные детерминанты хромосомной устойчивости с середины 1990-х гг. связаны с интеграцией геномного острова 1 (*Salmonella genomic island 1* — SGI1). SGI1 — геномный остров длиной 43 тыс. п.о., который первоначально описан у *S. Typhimurium DT104* [6] и кодирует устойчивость к множеству противомикробных препаратов, включая амоксициллин, гентамицин и сульфонамиды [7]. За встраиванием SGI1 последовали кумулятивные мутации в генах *gyrA* и *parC*, что привело к устойчивости к налидиксовой кислоте, а затем к ципрофлоксацину в 2002 г. Предполагается, что именно за счёт особенностей генетической организации — хромосомо-интегрированной резистентности — и объясняется клональный успех этой MDR-линии и её быстрое и широкое распространение по всему миру [5, 8]. В предыдущих исследованиях продемонстрировано, что приобретение SGI1 в сравнении с приобретением плазмид резистентности не требует затрат на приспособленность (бактериальный фитнес) во время роста в условиях ограниченного количества питательных веществ [9], что может непосредственно влиять на эффективное распространение антибиотикорезистентных штаммов и заставляет внимательно отслеживать тенденции и динамику циркуляции этого патогена не только в региональном, но и в глобальном масштабе.

Существующие исследования на основе данных полногеномного секвенирования и анализа популяционной структуры послужили полезной основой для понимания продолжающейся эволюции MDR-линии *S. Kentucky ST198* [5]. Штаммы MDR-линии до 2005 г. в основном обнаруживались в Египте и затем быстро распространились по Африке и Ближнему Востоку [4]. Ещё одним поводом для беспокойства является расширяющийся спектр

источников обнаружения штаммов MDR-линии *S. Kentucky ST198*. Первоначально они обнаруживались у автохтонной домашней птицы, но затем у различных животных и в пищевых продуктах (контаминированные сальмонеллой специи во Франции и США), стадах индеек в Германии и Польше, диких животных) [4, 10–12].

Согласно данным по мониторингу за сальмонеллезам, *S. Kentucky* не входит в десятку доминирующих сероваров сальмонелл в России. Случаи обнаружения сальмонелл из различных источников не превышают 0,3% на протяжении последних лет¹, что соответствует нескольким десяткам штаммов в год. При этом, согласно опубликованным данным, этот серовар не являлся этиологическим агентом случаев групповой заболеваемости с 2019 г. по настоящее время [13], а информация о выделении штаммов *S. Kentucky ST198* в России ограничивается единичными случаями [14]. Вместе с тем вопрос о структуре популяции российских штаммов и их генетической характеристике сравнительно со штаммами, циркулирующими в других регионах мира, остаётся открытым.

Цель работы — исследование штаммов *S. Kentucky*, выделенных из различных источников в России, в аспекте их филогенетического положения в масштабах глобального разнообразия патогена и определения их генетических особенностей.

Материалы и методы

Отбор изолятов и микробиологические исследования

В период с 2010 по 2022 г. проведено исследование 55 штаммов *S. Kentucky*, выделенных на территории регионов Российской Федерации из различных источников.

Микробиологический анализ штаммов сальмонелл

Перед проведением процедуры экстракции тотальной ДНК для полногеномного секвенирования проводили рассев бактериальной культуры до единичных колоний и подтверждение серовара с использованием поликлональных («ПЕТСАЛ») и моноклональных («Sifin») сывороток.

Полногеномное секвенирование

Тотальную ДНК из 7×10^9 КОЕ экстрагировали с использованием набора «Рибо-преп» («Амплисенс»). Геномные библиотеки для полногеномного секвенирования каждого штамма сальмонелл готовили из 70 нг тотальной ДНК с использованием

¹ Информационные бюллетени референс-центра по мониторингу за сальмонеллезам № 35–26.

² URL: <https://www.epid-oki.ru/otchety.html>

набора «NexteraXT» («Illumina»). Массовое параллельное секвенирование проводили на платформах MiSeq, HiSeq, NextSeq («Illumina»).

Обработка данных полногеномного секвенирования и *de novo* сборка геномов

Удаление адаптеров, нуклеотидных прочтений низкого качества проводили с использованием пакета BBTools². *De novo* сборку контигов для каждого из штаммов проводили с помощью ассемблера SKESA [15]. Количество нуклеотидных прочтений и качество сборки считали достаточным для дальнейшего анализа при соблюдении следующих условий: (1) если была достигнута в среднем более чем 30-кратная глубина секвенирования при обратном картировании исходных нуклеотидных прочтений на собранные контиги; (2) соблюдались требования к метрикам полученных контигов³: общая длина контигов от 4 до 5,8 млн п.о., N50 более 20 тыс. п.о., число контигов — менее 600, доля нуклеотидов «N» — менее 3%, процент контигов, относящихся к роду *Salmonella*, — более 70%. На завершающем этапе валидации полученные контиги использовали для подтверждения принадлежности секвенированного штамма к серовару *S. Kentucky* с помощью программ SISTR [16] и SeqSero [17].

Филогенетический анализ

Всего коллекция геномов для филогенетического анализа включала 445 геномов штаммов *S. Kentucky*, из них 55 штаммов российского происхождения (номера доступа в GenBank SAMN42109132–SAMN42109186) и 390 штаммов, секвенированных в предыдущих исследованиях [5, 9, 18, 19]. Биоинформатический анализ проводили на основе поиска информативных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) путём картирования нуклеотидных прочтений каждого из секвенированных бактериальных изолятов на референс-геном *S. Kentucky* (номер доступа в NCBI: CP028357) с использованием программного конвейера SnapperDB [20]. Анализ проводили со следующими параметрами: минимальная глубина консенсуса — 10х, минимальное качество картирования прочтения для учёта вариации — 30, минимальная доля мажорного варианта — 90%, минимальное требуемое среднее покрытие по всему геному — 30х. Полученные профили SNP были конвертированы в формат выравнивания. Последующую реконструкцию филогенетического дерева и удаления SNP, расположенных в областях рекомбинаций, проводили в программе

«Gubbins v. 3.2.1» [21]. Для подтверждения топологии дерева проводили бутстреп-анализ с 1000 повторениями. Филогенетические сублинии (генетически однородные группы профилей SNP) определяли с использованием программы «Fastbaps» с параметрами «optimise.baps». В результате использовали кластеры, идентифицированные на первом уровне кластеризации [22].

Определение сиквенс-типа, генетических детерминант антибиотикорезистентности и репликонов плазмид

ST на основе 7 генов домашнего хозяйства определяли с использованием программы mlst⁴. Поиск генов и точечных мутаций антибиотикорезистентности проводили с использованием «AMRFinderPlus v. 3.10.40» с параметрами «-I 0.9 –c 0.6 –O Salmonella» (минимальный процент идентичности — 90%, минимальное перекрытие — 60% с фильтрацией результатов, характерных для рода *Salmonella*) [23]. Определения типа плазмид проводили с помощью программы «MOB-suite v. 3.0.0» [24].

Анализ SG11

Установление наличия и анализ гипотетической структуры острова SG11 у исследуемых штаммов сальмонелл проводили путём картирования коротких нуклеотидных прочтений каждого из геномов на референс-последовательность SG11-K (номер доступа в базе NCBI AY463797.8). В выборку для сравнения мы также включили геномы *S. Kentucky*, которые характеризовались различными вариантами острова SG11-K, а также другими производными вариантами острова SG11-K — SG11-P и SGI-Q [5].

Результаты

Согласно результатам анализа основная часть штаммов ($n = 50$) относилась к ST198 (90,9%), 4 (7,3%) штамма были представлены ST314 и только 1 (1,8%) штамм — ST152. Штаммы с этими ST принадлежали к отдельным филогенетическим линиям с высоким уровнем генетической дивергенции на уровне профилей коровых SNP, что свидетельствовало о полифилетической природе этого серовара, т.е. предковые штаммы этих ST эволюционно приобрели одни и те же O-антигены путём конвергентной эволюции (рис. 1, а) [25]. Поскольку основная часть российских штаммов принадлежала к генотипу ST198, дальнейший анализ был сосредоточен на детальном анализе этой группы. В качестве выборки для сравнения мы использовали ранее секвенированные геномы *S. Kentucky* ST198,

² BBTools. URL: <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/> (дата обращения 12.12.2023).

³ Enterobase. Quality Assessment evaluation. URL: <https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/pipelines/backend-pipeline-qevaluation.html> (дата обращения 12.12.2023).

⁴ MLST: scan contig files against traditional PubMLST typing schemes. URL: <https://github.com/tseemann/mlst> (дата обращения 12.12.2023).

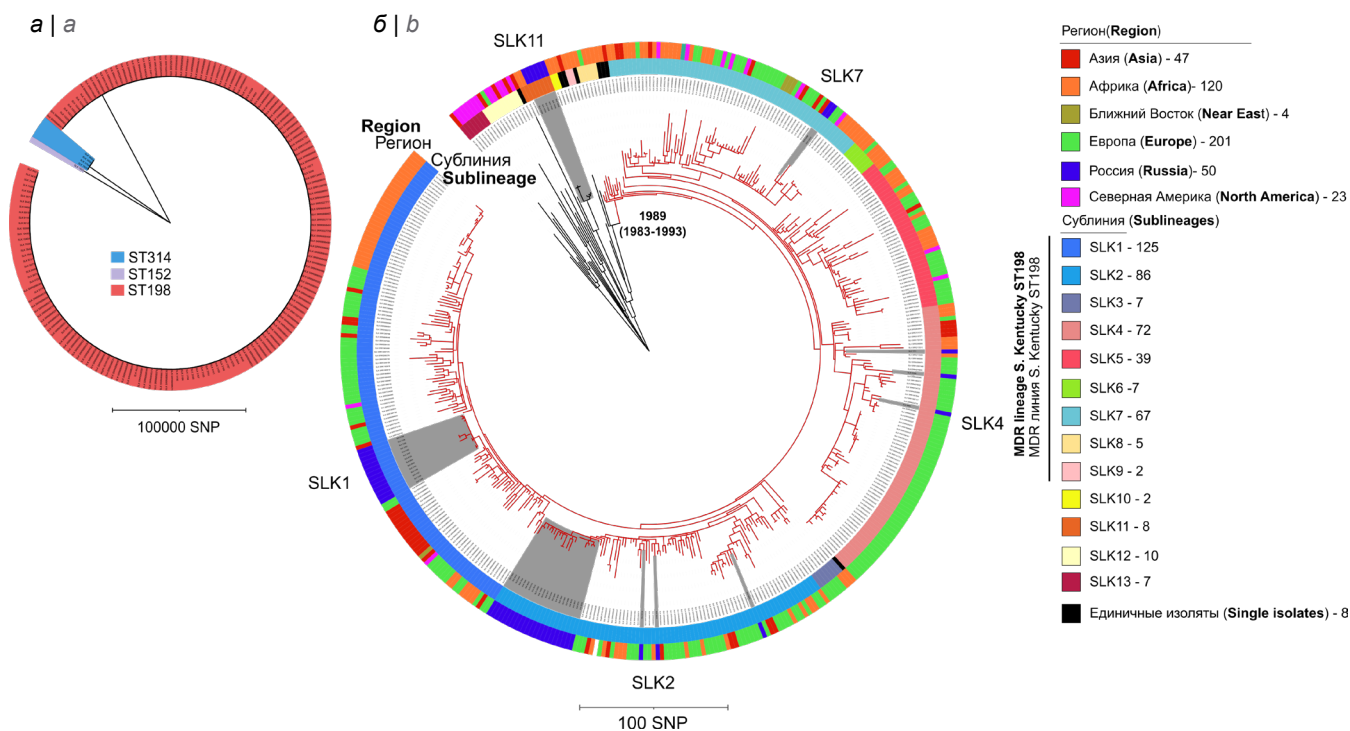


Рис. 1. Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия.

а — дерево построено на основе SNP 173 штаммов *S. Kentucky* ST314, ST152 и ST198. Штаммы, относящиеся к отдельным сиквенс-типам, принадлежат к отдельным филогенетическим линиям с высоким уровнем генетической дивергенции;
б — maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed based on SNPs of 445 *S. Kentucky* sequence-type ST198 strains. The genome of strain 98K (accession number SRR6898532), isolated in the USA in 1937 from chicken, was used as an outgroup. The clade shown in red indicates the MDR lineage *S. Kentucky* ST198, which includes nine sublineages SLK1-SLK9, identified in the Fastbaps program. The date of MDR lineage origin (1989 year) is indicated according to J. Hawkey et al., 2019 [5]. The outer sectors of different colors represent the geographic regions in which the strains were isolated. Gray sectors on the tree highlight 50 strains of *S. Kentucky* ST198 isolated in Russia.

Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree.

а — tree reconstructed based on SNPs of 173 *S. Kentucky* strains of sequence types ST314, ST152, and ST198. Strains belonging to individual sequence types belong to separate phylogenetic lineages with a high level of genetic divergence;
b — maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed based on SNPs of 445 *S. Kentucky* sequence-type ST198 strains. The genome of strain 98K (accession number SRR6898532), isolated in the USA in 1937 from chicken, was used as an outgroup. The clade shown in red indicates the MDR lineage *S. Kentucky* ST198, which includes nine sublineages SLK1-SLK9, identified in the Fastbaps program. The date of MDR lineage origin (1989 year) is indicated according to J. Hawkey et al., 2019 [5]. The outer sectors of different colors represent the geographic regions in which the strains were isolated. Gray sectors on the tree highlight 50 strains of *S. Kentucky* ST198 isolated in Russia.

которые депонированы в международных базах данных ($n = 390$). Эти штаммы характеризовались широким временным интервалом (1937–2022 гг.), географическим диапазоном получения штаммов (5 континентов), а также относились к разнообразным источникам выделения (человек, пищевые продукты, животные, окружающая среда).

Филогенетический анализ 440 штаммов ST198 позволил определить 13 сублиний (генетических кластеров BAPS), представленных более чем 1 штаммом. При этом 9 сублиний относились к международной монофилитической MDR-линии *S. Kentucky* ST198, а 4 занимали базальное положение по отношению к ней (рис. 1, б). Базальные клады каждой сублинии международного MDR-клона включали штаммы, выделенные в странах Африки, что подтверждает гипотезу о возникновении MDR-линии *S. Kentucky* ST198 на африканском континенте и последующем распространении по всему миру.

Из 50 российских штаммов ST198 44 штамма принадлежали к международной монофилитической MDR-линии *S. Kentucky* ST198 и относились к 4 отдельным сублиниям (SLK-1, SLK-2, SLK-4, SLK-7), а 6 штаммов относились к сублинии SLK-11 и занимали базальное положение по отношению к MDR-линии *S. Kentucky* ST198 (рис. 1, б). Наибольшее число российских штаммов *S. Kentucky* ($n = 25$) относилось к сублинии SLK-2, наименьшее — к сублинии SLK-7 ($n = 2$). Отметим, что сублиния SLK-4 была в основном представлена штаммами из Европы.

Филогенетический анализ и географический регион выделения штаммов *S. Kentucky* на территории России не выявил корреляций. Вместе с тем для российских штаммов сублинии SLK-2 характерна преимущественная изоляция на территории североазиатской части России (Омская и Иркутская области, Республика Бурятия, Красноярский и Алтайский края), в то время как для сублинии

SLK-11 — на территории европейской части России (Московская и Тульская области), а штаммы, относящиеся к сублиниям SLK-1, SLK-7 и SLK-4, обнаруживались на обеих территориях.

Анализ генетической кластеризации российских штаммов *S. Kentucky* на уровне различий в

пределах 5 SNP позволил определить 6 t5-SNP-кластеров, которые относились к 3 сублиниям (рис. 2). Два t5-кластера были связаны с сублинией SLK-2. Один из t5-кластеров включал 8 штаммов, которые были выделены из различных источников (человек, окружающая среда и пищевой продукт) в течение

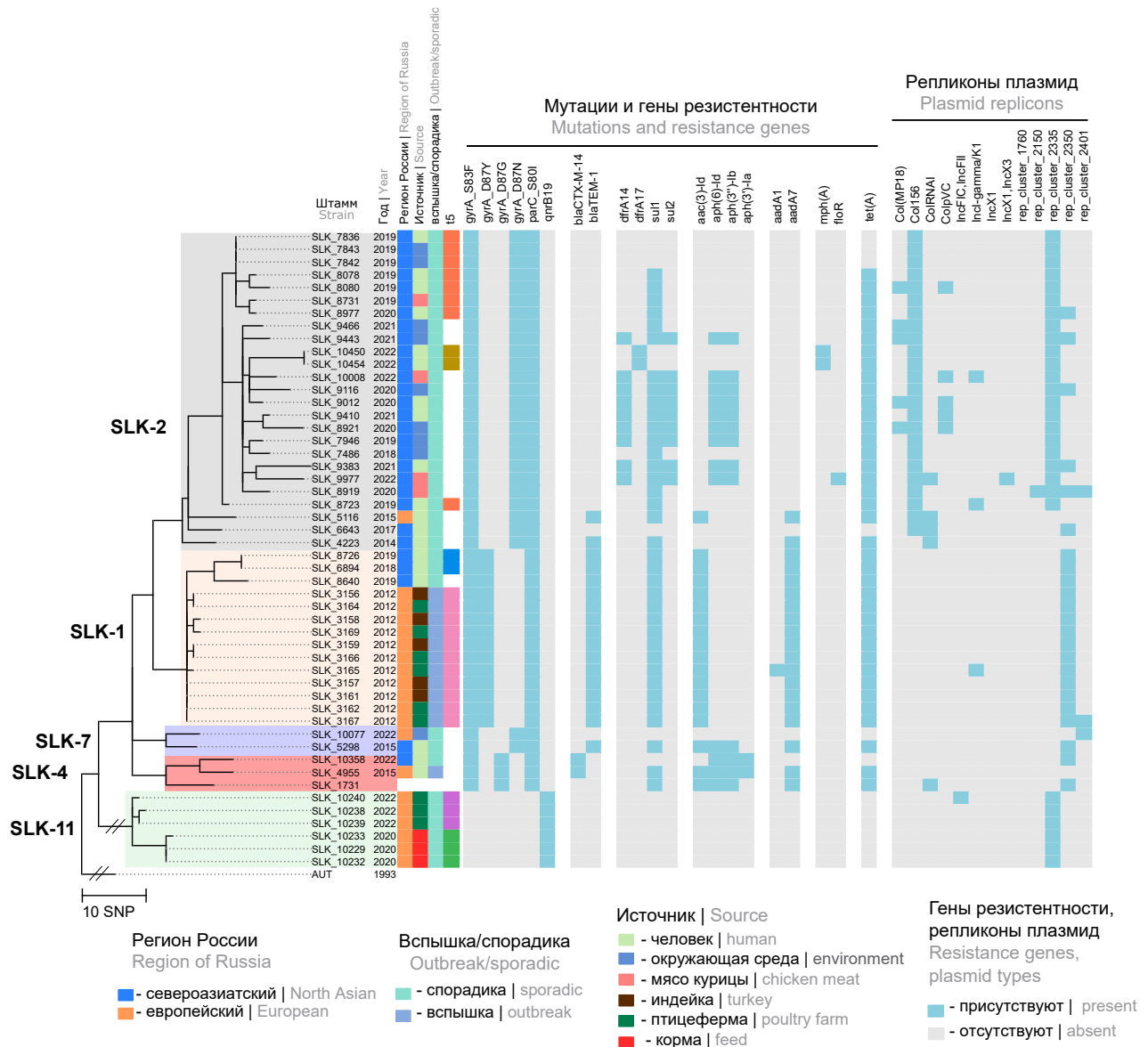


Рис. 2. Генетическое разнообразие и популяционная структура российских штаммов *S. Kentucky* ST198 ($n = 50$).

Филогенетическое дерево, реконструированное методом максимального правдоподобия на основе выравнивания SNP 51 штамма *S. Kentucky* ST198. В качестве аутгруппы использовали геном штамма *S. Kentucky* 93-6429 (номер доступа в архиве коротких прочтений SRR6898537), выделенный от человека в 1993 г. в Индонезии. Отдельные клады на филогенетическом дереве соответствуют выявленным генетическим группам российских изолятов *S. Kentucky*. В представленной схеме для каждого исследованного изолята отражены информация о регионах выделения штаммов; источниках; эпидемиологической ситуации, при которой изолированы штаммы (вспышка/спорадика); выявленные генетические кластеры на уровне различий в 5 SNP (t5-SNP-кластеры); информация о присутствии или отсутствии генетических детерминант антибиотикорезистентности и репликонов плазмид.

Fig. 2. Genetic diversity and population structure of Russian strains of *S. Kentucky* ST198 ($n = 50$).

Maximum likelihood phylogenetic tree reconstructed based on SNP alignment of 51 *S. Kentucky* sequence-type ST198 strains. The genome of the *S. Kentucky* strain 93-6429 (short read archive accession number SRR6898537), isolated from a human in 1993 in Indonesia, was used as an outgroup. Individual clades on the phylogenetic tree correspond to the identified sublineages of Russian *S. Kentucky* isolates. The diagram shows isolate information: geographic region of isolation, source of strain, the epidemiological situation (outbreak/sporadic), identified genetic clusters at the level of differences in 5 SNPs (t5-SNP clusters), as well as information about the presence or the absence of genetic determinants of antibiotic resistance and plasmid replicons.

2019–2020 гг. Второй кластер включал 2 штамма, выделенных от человека в 2022 г.

Российские штаммы *S. Kentucky* сублинии SLK-1 также включали 2 отдельных t5-SNP-кластера, к которым относилось 14 штаммов. Первый кластер включал 12 штаммов, выделенных из окружающей среды птицефермы и индейки во время энзоотии сальмонеллеза у птицы, тем самым подтверждая клональную связь случаев обнаружения сальмонелл на птицеферме. Второй кластер включал 2 спорадических штамма от человека в 2018 и 2019 гг.

Для сублинии SLK-11 были характерны 2 t5-SNP-кластера: 1 кластер — для штаммов, выделенных из комбикормов для индеек в 2020 г., другой — для штаммов, выделенных из помета индеек на птицеферме в 2022 г.

Генетические детерминанты антибиотикорезистентности и разнообразия плазмид *S. Kentucky* ST198

Все штаммы ST198, выделенные в России, содержали гены или мутации, ответственные за антибиотикорезистентность. При этом 62% штаммов содержали в общей сложности 6–11 генов резистентности. Всего среди 50 штаммов было выявлено 320 генов и мутаций, ответственных за резистентность к противомикробным препаратам. Наиболее часто встречались точечные мутации в области QRDR, определяющей устойчивость к хинолонам, а именно в генах *gyrA* (S83F) — 13,8% и *parC* (S80I) — 13,8%. Ген устойчивости к тетрацикламам *tetA* встречался у 11,9% штаммов. Гены *bla*_{TEM-1}, *aac(3)-Id* и *aadA7* присутствовали в 5% штаммов.

При анализе различных сочетаний генетических детерминант резистентности обнаружено 14 комбинаций. Наиболее часто встречаемой (26%) была комбинация *gyrA*(S83F, D87Y)–*parC*(S80I)–*bla*_{TEM-1}–*sull-1-aac(3)-Id-aadA7-tet(A)*, 2-е и 3-е места по частоте встречаемости (по 8%) занимали комбинации *gyrA*(S83F, D87N)–*parC*(S80I)–*sull-1-tet(A)* и *gyrA*(S83F, D87N)–*parC*(S80I)–*dfrA14-sull-1-sul2-aph(6)-Id-aph(3'')-Ib-tet(A)*.

Характер набора выявленных генов и мутаций резистентности в достаточной степени соответствовал филогенетической кластеризации изучаемых штаммов. Для всех штаммов сублинии SLK-2 было характерно наличие 3 хромосомных мутаций (*gyrA* (S83F, D87N) и *parC* (S80I)), а гены *dfrA14*, *sull1*, *sul2*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib* и *tetA* встречались у большей части штаммов. При этом в сравнении с другими в группе штаммов SLK-2 после 2015 г. отсутствовали гены *bla* и *aadA*.

Российские штаммы сублинии SLK-1 также несли 2 мутации в QRDR-регионе — *gyrA*(S83F) и *parC*(S80I), но отличались от сублинии SLK-2 мутацией в гене *gyrA*(D87Y). Все штаммы несли одно-

типный набор генов резистентности *bla*_{TEM-1}–*sull-1-aac(3)-Id-aadA7-tet(A)*.

Для 2 штаммов сублинии SLK-7, как и для SLK-2, были характерны аналогичные мутации в генах *gyrA* (S83F, D87N) и *parC* (S80I). При этом штамм SLK_5298 включал весь набор генов, характерный для геномного острова SG11-K *bla*_{TEM-1}–*sull-1-aac(3)-Id-aph(6)-Id-aph(3'')-Ib-aadA7-tet(A)* [19], а штамм SLK_10077 характеризовался отсутствием генов резистентности.

Штаммы сублинии SLK-4 характеризовались набором в *gyrA* (S83F, D87G) и *parC* (S80I). Более того, 2 штамма (SLK_10358 и SLK_4955) несли ген *bla*_{CTX-M-14}, помимо других генов, кодирующих резистентность к антибиотикам.

В сравнении с остальными штаммами у представителей сублинии SLK-11 был выявлен только плазмид-опосредованный ген резистентности *qnrB19*. Мутаций в QRDR-регионе и других генов резистентности не выявлено.

Анализ разнообразия плазмид позволил определить наличие 13 известных типов несовместимости плазмид среди секвенированных российских изолятов. Наиболее часто встречались Col156, *rep_cluster_2335* и *rep_cluster_2350*. Наибольшее разнообразие плазмид было характерно для штаммов сублинии SLK-2, которые, помимо вышеперечисленных плазмид, включали группы IncX, Inc-gamma, ColpVC.

Анализ острова SG11

Присутствие в секвенированных геномах генов острова SG11 рассматривалось как свидетельство встраивания SG11 в хромосому бактерии, а именно в область с 3'-конца гена *trmE* до 5'-конца гена *uidY*. Результаты анализа перекрытия референсной последовательности SG11-K для российских штаммов *S. Kentucky* представлены на рис. 3.

Основные отличия в вариантах SG11-K заключаются в вариации не только состава генов острова, но и набора транспозонов. В частности, референтный SG11-K несёт набор из 5 транспозонов *Int4-Tn21-Tn1721-Tn5393-Tn3*, в свою очередь ранее описанный вариант SG11-K у штамма 08-KS6 характеризуется отсутствием транспозона *Tn5393* и укороченным вариантом транспозона *Tn1721* (*Int4-Tn21-ΔTn1721-Tn3*), у штамма 08-5707 укорочен транспозон *Tn5393* (*Int4-Tn21-Tn1721-ΔTn5393-Tn3*), а у штамма 07-1511 присутствуют только 3 транспозона (*Tn1721-Tn21-Tn3*) с инверсией региона.

Штаммы сублинии SLK-11 характеризовались отсутствием как генов острова SG11, так и мобильных генетических элементов *Int4*, *Tn21*, *Tn1721*, *Tn3*, свойственных SG11-K, что свидетельствует об отсутствии интеграции острова SG11 в хромосому.

Для штаммов сублинии SLK-2 перекрытие референс-последовательности SG11-K варьировало от 19 до 61%. При этом большинство штаммов ха-

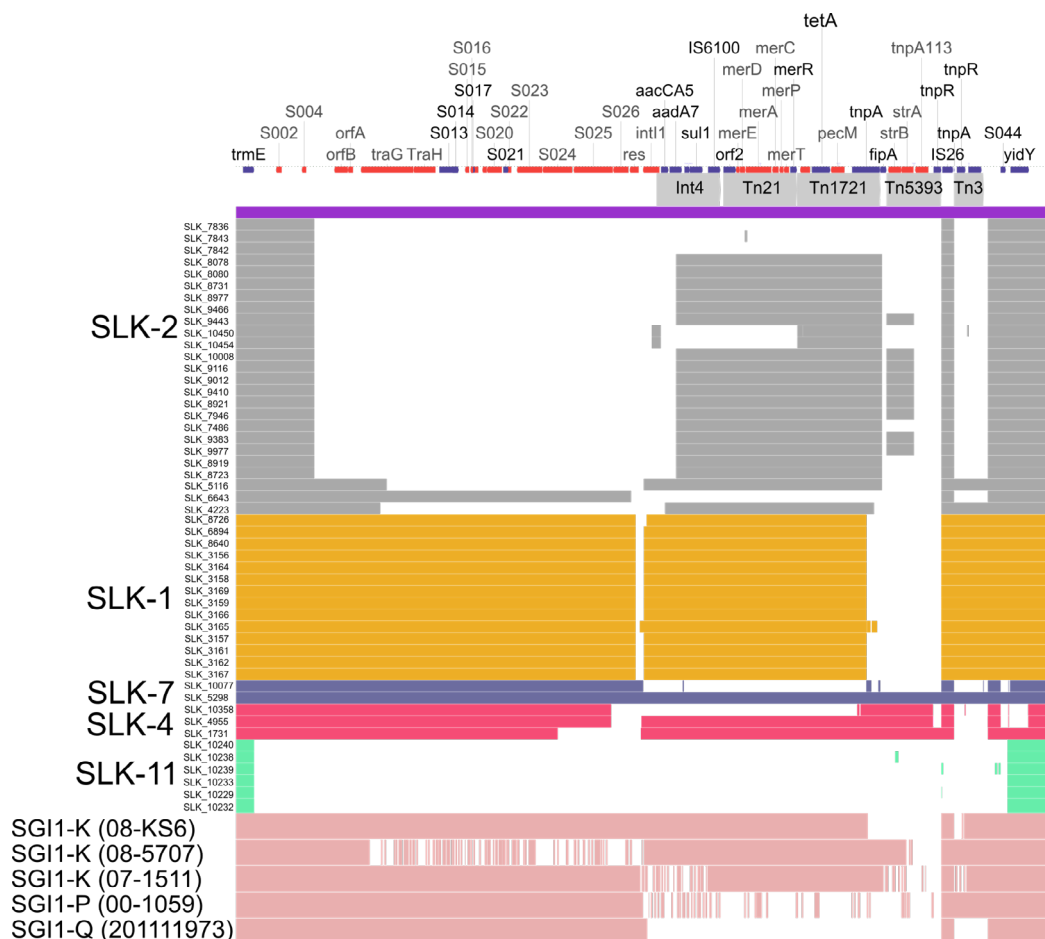


Рис. 3. Степень и характер перекрытия референсной последовательности SGI1-K (номер доступа в базе NCBI AY463797.8) короткими нуклеотидными прочтениями каждого из сравниваемых геномов.

Порядок штаммов в диаграмме соответствует порядку штаммов на филогенетическом дереве на рис. 2.

Fig. 3. The degree and nature of overlap of the reference sequence SGI1-K (NCBI accession number AY463797.8) with short nucleotide reads of each of the compared genomes.

The order of strains in the diagram corresponds to the order of strains in the phylogenetic tree in Fig. 2.

рактировалось отсутствием основной части генов острова в диапазоне от гена *S005* до гена *resG* и наличием транспозонов *Int4*, *Tn21*, *Tn1721*, несущих гены резистентности. В штаммах SLK_7836, SLK_7843 и SLK_7842, для которых отсутствовали мобильные элементы, было также характерно отсутствие генов антибиотикорезистентности. Штамм SLK_6643 характеризовался сходным характером перекрытия референс-последовательности с SGI1-Q. В свою очередь, штаммы SLK_5116 и SLK_4223 были аналогичны варианту SGI1-K 08-5707 с делецией коровых генов *traG-resG* и с набором мобильных элементов *Int4-Tn21-Tn1721-Tn3*.

Все штаммы сублинии SLK-1 имели аналогичный состав генов острова SGI1 и 90% перекрытия референс-последовательности SGI1-K. Набор мобильных элементов, включающий *Int4-Tn21-Tn1721-Tn3*, был аналогичен варианту SGI1-K, которые описан ранее в штамме 08-KS6.

В сублинии SLK-7 штамм SLK_10077 характеризовался 60% процентным перекрытием рефе-

рентной последовательности за счёт наличия генов острова и отсутствием мобильных элементов, что коррелировало с отсутствием генов резистентности при анализе контигов. При этом нуклеотидные прочтения штамма SLK_5298 на 100% перекрывали референс-последовательность SGI1-K.

Штаммы сублинии SLK-4 характеризовались различающимися вариантами SGI1. Так, для штамма SLK_10358 (61% перекрытия) было характерно наличие всех генов острова, а из мобильных элементов присутствовал только транспозон *Tn5393*. Штаммы SLK_4955 (87% перекрытия) и SLK_1731 (85% перекрытия) характеризовались сходным набором транспозонов *Int4-Tn21-Tn1721-Tn5393*. Однако в SLK_1731 отсутствовали гены острова SGI1 (*S025-resG*).

Обсуждение

Эпидемиологическая значимость серовара *S. Kentucky* обусловлена его потенциалом к распространению, приспособляемости к различным

условиям окружающей среды и генетическими механизмами, включая хромосомный и плазмидопосредованный, позволяющими реализовывать резистентность к широкому спектру противомикробных препаратов. Наряду с высокой долей штаммов, резистентных к ципрофлоксацину, зарегистрированы случаи комбинированной резистентности к ципрофлоксацину и цефотаксиму (цефалоспорины III поколения). В частности, штаммы с комбинированной устойчивостью были зарегистрированы на о. Мальта и относились к бактериальным изолятам, продуцирующим БЛРС [26]. Описаны также штаммы *S. Kentucky* с генами БЛРС (CTX-M-1, -M-14, -M-15, -M-104), цефалоспориноаз AmpC β-лактамаз (CMY-2 и -4) и карбапенемаз (VIM-2, OXA-48, NDM-1), локализованных не только на плазидах, но и в хромосомном регионе SGII [4, 5, 19, 26–29]. Хотя сальмонеллез считается строго зоонозной инфекцией, высказываются предположения о распространении некоторых эпидемических клонов *S. Kentucky* от человека к человеку и о том, что человек является резервуаром [18].

К настоящему времени известны 10 различных ST *S. Kentucky*, 3 из которых (ST198, ST152 и ST314) встречаются наиболее часто [30]. В ряде случаев отмечается разная представленность этих ST — как территориально (межстрановые различия), так и относительно источников изоляции сальмонелл [31, 32]. Вместе с тем отмечено преобладание ST198 и ST152 у людей и у домашней птицы [33]. В нашем исследовании более 90% штаммов, ассоциированных с различными источниками выделения, относились к ST198, а ST152 был представлен единичным штаммом, что согласуется с международными данными.

Использование полногеномного секвенирования является золотым стандартом и универсальным инструментом геномного эпидемиологического надзора за социально значимыми патогенами [34, 35]. Возможность иерархической кластеризации филогенетически значимых маркеров определённого патогена на разных уровнях детализации и сравнения с последовательностями, депонированными в международных базах данных, не только даёт ценную информацию о тенденциях эволюции и оценке факторов распространения патогена в мировом масштабе, но и позволяет определить клонально-родственные связи между штаммами для эпидемиологического расследования вспышечной и спорадической заболеваемости [36–38].

Согласно проведённому филогенетическому анализу основная часть штаммов ST198, циркулирующих на территории России, относилась к 4 основным сублиниям международной монофилитической MDR-линии *S. Kentucky* ST198, которая включает штаммы с MDR-фенотипом к противомикробным препаратам [5]. Основная часть россий-

ских штаммов относилась к филогенетическим сублиниям SLK-1 и SLK-2. При этом длительный период изоляции штаммов из различных источников, относящихся к этим 2 сублиниям, может свидетельствовать о наличии 2 устоявшихся и генетически различающихся субпопуляций MDR-линии *S. Kentucky* ST198 на территории России. Интересно отметить, что характер филогенетической кластеризации на отдельные сублинии совпадал с определённой комбинацией из 3 мутаций в генах *gyrA* и *parC*, определяющей устойчивость к хинолонам, что позволяет использовать их в качестве маркеров для дифференциации российских штаммов *S. Kentucky* ST198 на основные филогенетические сублинии.

Два штамма сублинии SLK-4 — SLK_10358 (Иркутск, спорадический случай заболевания в 2022 г.) и SLK_4955 (репрезентативный штамм со вспышки сальмонеллеза в Ижевске в 2015 г.) — относились к представителям филогенетической сублинии, которая была ассоциирована с укоренившейся с 2005 г. в европейских странах популяцией *S. Kentucky* [18]. Особенностью этих ципрофлоксацин-резистентных штаммов *S. Kentucky* является наличие интегрированного в хромосому гена *bla*_{CTX-M-14}, кодирующего БЛРС [18]. Этот ген также обнаруживался и в российских штаммах сублинии SLK-4. Случаи изоляции подобных штаммов могут указывать на единичные и независимые случаи заноса штаммов *S. Kentucky bla*_{CTX-M-14} с территории стран ЕС, однако это предположение требует исследования расширенной выборки штаммов.

Полученные данные, основанные на определении генетически близких штаммов, с использованием подхода кластеризации на уровне, не превышающем 5 нуклеотидных вариаций между штаммами (t5-SNP-кластер), выявил 6 групп клонально-родственных штаммов внутри 3 сублиний российских штаммов *S. Kentucky* ST198. При этом размер групп варьировал от 2 до 11 штаммов. В большинстве случаев выявленные t5-кластеры были связаны с циркуляцией определённого клона *S. Kentucky* ST198 на ограниченной территории и в относительно короткий промежуток времени (не более 1 года): при эпизоотической вспышке сальмонеллеза на птицеферме для индеек в Тульской области (2012 г.); выявлении штаммов сальмонелл в помёте индеек на птицеферме в Московской области (2022 г.); в комбикорме для индеек в (2020 г.); а также при 2 независимых случаях сальмонеллеза у людей в Ангарске и Иркутске в 2022 г. Вместе с тем наши исследования демонстрируют возможность существования скрытой циркуляции определённого клона *S. Kentucky* ST198 с выявлением штаммов в 2019 и 2020 гг. в Омске ($n = 7$) и Иркутске ($n = 1$), которые были ассоциированы со спорадическими случаями заболевания сальмонеллёзом и выделением сальмонелл из объектов окружающей среды и из пищевых

продуктов, тем самым указывая на вероятную эпидемиологическую связь.

Применяемый в нашей работе подход к анализу структуры геномного острова SGI1 позволил нам опосредованно оценить его состав и продемонстрировать чувствительность данного геномного региона к генетическим перестройкам, вызываемым активностью транспозиционных элементов [5, 9, 19]. Эти перестройки могут привести к удалению некоторых или всех генов внутри SGI1 [5]. В большинстве случаев для российских штаммов характерно присутствие вариантов SGI1-K. Тем не менее в ряде геномов обнаруженный набор транспозонов отличался от существующих вариантов SGI1, что, вероятно, свидетельствует о присутствии нового варианта геномного острова. Высокая вариация этого острова также была отмечена в предыдущих исследованиях, где почти каждый штамм характеризовался различающимся по структуре SGI1. Помимо крупных делеций острова SGI1, некоторые штаммы имели инверсии всего или части сегмента, включающих гены устойчивости, а также перестановки транспозонов [5].

Анализ организации SGI1 и филогенетическая кластеризация штаммов на основе анализа профилей SNP в общих чертах соотносились друг с другом для различных сублиний SLK. Однако у штаммов SLK-2, принадлежащих к одному t5-SNP-кластеру, структура SGI1 демонстрировала отличия в наборе транспозонов. Подобные расхождения могут свидетельствовать о высокой скорости генетических перестроек региона SGI1 у клонально-родственных штаммов и объяснять разницу в наборе генов антибиотикорезистентности.

Присутствие SGI1 коррелировало с обнаруженным набором генов антибиотикорезистентности. Большинство штаммов (86%) характеризовались наличием генов *aadA7*, *bla_{TEM-1}*, *sul1* и *tetA*, которые, как известно, ассоциированы с SGI1 у штаммов *S. Kentucky* ST198 [19].

В совокупности выявленные гены устойчивости к противомикробным препаратам являлись ответственными за устойчивость к различным классам антибиотиков, включая аминогликозиды, β-лактамы, фениколы, хинолоны, сульфонамиды и тетрациклины. Основываясь на полученных данных, мы не можем уверенно говорить об ассоциации определённых генов резистентности с обнаруженным типом плазмид из-за отсутствия завершённой сборки генома. Однако полученные данные о разнообразии типов плазмид указывают на их способность к передаче генов устойчивости. Было показано, что малые плазмиды ColRNAI — «*ger_cluster_2335*» и «*ger_cluster_2350*» могут успешно нести разнообразный спектр генов резистентности, в частности, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV-11}*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-1}*, *ac(3)-IIa*, *strB*, *strA*, *aadA16*, *qnrB66*, *oqxA* и *oqxB* [39–42].

Заключение

Несмотря на относительно небольшую выборку штаммов, нам удалось не только приблизиться к пониманию популяционной структуры российских штаммов *S. Kentucky* ST198 в мировом масштабе, но и провести детальное исследование генетических детерминант антибиотикорезистентности, включая структуру геномного острова SGI1. Полученные данные служат основой для понимания и отслеживания продолжающейся эволюции MDR-линии, которая представляет собой глобально распространённый клон, способный к быстрой экспансии и накоплению детерминант устойчивости к противомикробным препаратам. Наши данные демонстрируют случаи циркуляции клонально-родственных штаммов *S. Kentucky* ST198 в различных источниках, что свидетельствует о необходимости развития комплексного подхода в надзоре за сальмонеллёзом на основе концепции «Единое Здоровье».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A., et al. *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA J.* 2019;17(2):e05596. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596>
- Le Hello S., Harrois D., Bouchrif B., et al. Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 2013;13(8):672–9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70124-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70124-5)
- Le Hello S., Weill F.X., Guibert V., et al. Early strains of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky sequence type 198 from Southeast Asia harbor *Salmonella* genomic island 1-J variants with a novel insertion sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(10):5096–102. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00732-12>
- Le Hello S., Hendriksen R.S., Doublet B., et al. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J. Infect. Dis.* 2011;204(5):675–84. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir409>
- Hawkey J., Le Hello S., Doublet B., et al. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198. *Microb. Genom.* 2019;5(7):e000269. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000269>
- Bie L., Fang M., Li Z., et al. Identification and characterization of new resistance-conferring SGI1s (*Salmonella* genomic island 1) in *Proteus mirabilis*. *Front. Microbiol.* 2018;9:3172. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03172>
- Doublet B., Golding G.R., Mulvey M.R., Cloeckert A. Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. *PLoS One.* 2008;3(4):e2060. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002060>
- Le Hello S., Bekhit A., Granier S.A., et al. The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain. *Front. Microbiol.* 2013;4:395. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00395>
- Cohen E., Davidovich M., Rokney A., et al. Emergence of new variants of antibiotic resistance genomic islands among multi-drug-resistant *Salmonella enterica* in poultry. *Environ. Microbiol.* 2020;22(1):413–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14858>
- Beutlich J., Guerra B., Schroeter A., et al. Highly ciprofloxacin resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates in turkey meat and a human patient. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2012;125(3-4):89–95. (in German)

11. Münch S., Braun P., Wernery U., et al. Prevalence, serovars, phage types, and antibiotic susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from animals in the United Arab Emirates from 1996 to 2009. *Trop. Anim. Health Prod.* 2012;44(7):1725–38. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0130-4>
12. Wasyl D., Hoszowski A. First isolation of ESBL-producing *Salmonella* and emergence of multiresistant *Salmonella* Kentucky in turkey in Poland. *Food Res. Int.* 2012;45(2):958–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.024>
13. Павлова А.С., Кулешов К.В., Крутова Н.Е. и др. Характеристика антибиотикорезистентности нетифоидных сальмонелл, циркулирующих на территории Российской Федерации в период с 2019 по 2022 год. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2023;100(5):287–301. Pavlova A.S., Kuleshov K.V., Krutova N.E., et al. Characteristics of antibiotic resistance of non-typhoidal *Salmonella* circulating in the Russian Federation in the period from 2019 to 2022. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2023;100(5):287–301. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-451> EDN: <https://elibrary.ru/tmxvam>
14. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А. Детекция международных клонов высокого риска *Salmonella* и *Escherichia coli* – возбудителей заболеваний, передающихся с пищевыми продуктами, в Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет.* 2020;10(3):565–9. Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Makarova M.A. Detection of international high-risk clones of food-borne pathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in the Russian Federation. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2020;10(3):565–9. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-DOI-150> EDN: <https://elibrary.ru/iybhmg>
15. Souvorov A., Agarwala R., Lipman D.J. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biol.* 2018;19(1):153. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1540-z>
16. Yoshida C.E., Kruczkiwicz P., Laing C.R., et al. The *Salmonella* In Silico Typing Resource (SISTR): an open web-accessible tool for rapidly typing and subtyping draft salmonella genome assemblies. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147101. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147101>
17. Zhang S., den Bakker H.C., Li S., et al. SeqSero2: rapid and improved *Salmonella* serotype determination using whole-genome sequencing data. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019;85(23):e01746-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01746-19>
18. Coipan C.E., Westrell T., van Hoek A.H.A.M., et al. Genomic epidemiology of emerging ESBL-producing *Salmonella* Kentucky bla CTX-M-14b in Europe. *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9(1):2124–35. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1821582>
19. Mashe T., Thilliez G., Chaibva B.V., et al. Highly drug resistant clone of *Salmonella* Kentucky ST198 in clinical infections and poultry in Zimbabwe. *npj Antimicrob. Resist.* 2023;1(1):6. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00003-6>
20. Dallman T., Ashton P., Schafer U., et al. SnapperDB: a database solution for routine sequencing analysis of bacterial isolates. *Bioinformatics.* 2018;34(17):3028–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty212>
21. Croucher N.J., Page A.J., Connor T.R., et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(3):e15. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
22. Tonkin-Hill G., Lees J.A., Bentley S.D., et al. Fast hierarchical Bayesian analysis of population structure. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(11):5539–49. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz361>
23. Feldgarden M., Brover V., Gonzalez-Escalona N., et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci. Rep.* 2021;11(1):12728. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>
24. Robertson J., Nash J.H.E. MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb. Genom.* 2018;4(8):e000206. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>
25. Timme R.E., Pettengill J.B., Allard M.W., et al. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters. *Genome Biol. Evol.* 2013;5(11):2109–23. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evt159>
26. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J.* 2019;17(2):e05598. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598>
27. Lei C.W., Zhang Y., Wang X.C., et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 with chromosomal integration of blaCTX-M-14b isolated from a poultry slaughterhouse in China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020;20:145–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.006>
28. Chen H., Song J., Zeng X., et al. National prevalence of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 with high-level resistance to ciprofloxacin and extended-spectrum cephalosporins in China, 2013 to 2017. *mSystems.* 2021;6(1):e00935-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00935-20>
29. El Hage R., Losasso C., Longo A., et al. Whole-genome characterisation of TEM-1 and CMY-2 β -lactamase-producing *Salmonella* Kentucky ST198 in Lebanese broiler chain. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020;23:408–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.002>
30. Achtman M., Wain J., Weill F.X., et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002776. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
31. Slowey R., Kim S.W., Prendergast D., et al. Genomic diversity and resistome profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky isolated from food and animal sources in Ireland. *Zoonoses Public Health.* 2022;69(1):1–12. DOI: <https://doi.org/10.1111/zph.12884>
32. Wang S., Liao X., Xiong Z., et al. Characterization of the emerging multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST314 in China. *Zoonoses Public Health.* 2021;68(6):622–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/zph.12850>
33. Soltys R.C., Sakamoto C.K., Oltean H.N., et al. High-resolution comparative genomics of *Salmonella* Kentucky aids source tracing and detection of ST198 and ST152 lineage-specific mutations. *Front. Sustain. Food Syst.* 2021;5:695368. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.695368>
34. Deng X., den Bakker H.C., Hendriksen R.S. Genomic epidemiology: whole-genome-sequencing-powered surveillance and outbreak investigation of foodborne bacterial pathogens. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2016;7:353–74. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033259>
35. Franz E., Gras L.M., Dallman T. Significance of whole genome sequencing for surveillance, source attribution and microbial risk assessment of foodborne pathogens. *Curr. Opin. Food Sci.* 2016;8:74–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.04.004>
36. Li S., He Y., Mann D.A., Deng X. Global spread of *Salmonella* Enteritidis via centralized sourcing and international trade of poultry breeding stocks. *Nat. Commun.* 2021;12(1):5109. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25319-7>
37. Pijnacker R., Dallman T.J., Tijsma A.S.L., et al. An international outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis linked to eggs from Poland: a microbiological and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 2019;19(7):778–86. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30047-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30047-7)
38. Chattaway M.A., Dallman T.J., Larkin L., et al. The transformation of reference microbiology methods and surveillance for *Salmonella* with the use of whole genome sequencing in En-

- gland and Wales. *Front. Public Health.* 2019;7:317.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00317>
39. Agyepong N., Govinden U., Owusu-Ofori A., et al. Genomic characterization of multidrug-resistant ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Ghanaian teaching hospital. *Int. J. Infect. Dis.* 2019;85:117–23.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.05.025>
40. Lerminiaux N., Mitchell R., Bartoszko J., et al. Plasmid genomic epidemiology of blaKPC carbapenemase-producing *Enterobacteriales* in Canada, 2010–2021. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023;67(12):e0086023.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00860-23>

Информация об авторах

Кулешов Константин Валерьевич — к.б.н., зав. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, konstantinkul@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Павлова Анастасия Сергеевна — н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4619-9337>

Кремлева Анна Александровна — н.с. отдела бактериологии Испытательной центральной научно-методической ветеринарной лаборатории Федерального центра охраны здоровья животных, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6290-6639>

Карпенко Анна Евгеньевна — н.с. лаб. молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0486-1353>

Михайлова Юлия Владимировна — к.б.н., зав. лаб. молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Крутова Наталья Евгеньевна — м.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2925-5376>

Лисицына Мария Романовна — м.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0009-2344-6383>

Попова Кристина Романовна — м.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3368-7833>

Веселова Ольга Александровна — н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5041-4370>

Подколзин Александр Тихонович — д.м.н., зам. директора по эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0044-3341>

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

Участие авторов: Кулешов К.В., Павлова А.С., Кремлева А.А., Карпенко А.Е., Михайлова Ю.В., Крутова Н.Е., Лисицына М.Р., Попова К.Р., Веселова О.А., Подколзин А.Т. — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Кулешов К.В., Павлова А.С., Кремлева А.А., Карпенко А.Е., Михайлова Ю.В. — организация сбора и обработки материала; Кулешов К.В., Кремлева А.А., Павлова А.С., Подколзин А.Т., Акимкин В.Г. — концепция и дизайн исследования, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 31.01.2024;
принята к публикации 10.04.2024;
опубликована 29.06.2024

41. Nakamura K., Seto K., Lee K., et al. Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25. *Microb. Genom.* 2023;9(3):mgen000959.
DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000959>
42. Rehman M.A., Rempel H., Carrillo C.D., et al. Virulence genotype and phenotype of multiple antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from broilers assessed from a «One-Health» perspective. *J. Food Prot.* 2022;85(2):336–54.
DOI: <https://doi.org/10.4315/JFP-21-273>

Information about the authors

Konstantin V. Kuleshov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, konstantinkul@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Anastasia S. Pavlova — researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4619-9337>

Anna A. Kremleva — researcher, Department of bacteriology of the Testing central scientific and methodological veterinary laboratory, Federal Centre for Animal Health, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6290-6639>

Anna E. Karpenko — researcher, Laboratory of molecular mechanisms of antibiotic resistance, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0486-1353>

Yuliya V. Mikhaylova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular mechanisms of antibiotic resistance, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Natalia E. Krutova — junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2925-5376>

Maria R. Lisitsyna — junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0009-2344-6383>

Kristina R. Popova — junior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3368-7833>

Olga A. Veselova — researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5041-4370>

Alexandr T. Podkolzin — D. Sci. (Med.), Deputy Director for epidemiology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0044-3341>

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

Author contribution: Kuleshov K.V., Pavlova A.S., Kremleva A.A., Karpenko A.E., Mikhaylova Yu.V., Krutova N.E., Lisitsyna M.R., Popova K.R., Veselova O.A., Podkolzin A.T. — collection and processing of material, statistical processing, writing the text; Kuleshov K.V., Pavlova A.S., Kremleva A.A., Karpenko A.E., Mikhaylova Yu.V. — organization of the collection and processing of material; Kuleshov K.V., Pavlova A.S., Kremleva A.A., Podkolzin A.T., Akimkin V.G. — concept and design of the study, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 31.01.2024;
accepted for publication 10.04.2024;
published 29.06.2024



Кампилобактериоз: генотипическая характеристика возбудителя и иммунологический статус пациентов

Лобзин Ю.В.^{1,2}, Ермоленко К.Д.^{1✉}, Макарова М.А.^{2,3}, Кафтырева Л.А.^{2,3},
Мартенс Э.А.^{1,2}, Полев Д.Е.², Ермоленко Е.И.^{2,4}

¹Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия;

²Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

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

⁴Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Кампилобактерии входят в число ведущих возбудителей острых кишечных инфекций. Тяжесть кампилобактериоза и формирование отдалённых осложнений могут быть обусловлены генотипом возбудителя, биологические свойства которого оказывают влияние на параметры иммунного ответа.

Целью исследования явились обнаружение наиболее распространённых генотипов эпидемических клонов возбудителей кампилобактериоза и оценка характера иммунного ответа и тяжести заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 203 пациента в возрасте от 1 мес до 17 лет с кампилобактериозом, проходивших лечение в 2019–2021 гг. в клинике ДНКЦИБ ФМБА. Подтверждение диагноза осуществляли методом полимеразной цепной реакции. Пробы пациентов также исследовали культуральным методом. Тотальную ДНК выделяли с использованием набора «QIAamp DNA Mini Kit». Поиск генетических детерминант, кодирующих факторы вирулентности, и MLST-типирование проводили в программе «ResFinder». Иммунный статус пациентов изучали на 1-й и 7-й дни заболевания. Иммунологическое исследование включало определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G, С-реактивного белка, интерлейкинов-1 β , -1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, фактора некроза опухоли- α и интерферона- γ .

Результаты. При анализе распространённости сиквенс-типов кампилобактерий, выявленных у детей с клиникой кишечной инфекции, установлено, что наиболее схожим является профиль выделяемых изолятов в странах Северной Америки (США и Канада), Северной Европы (Великобритании, Голландия) и Скандинавии (Дания, Швеция, Финляндия). Выявление возбудителя с генотипом *figE*⁺, *cdtA*⁺, *cdtC*⁺ сопровождалось статистически значимым повышением уровня интерлейкина-8, снижением содержания IgA в сыворотке периферической крови, что отражало низкую эффективность иммунного ответа при инфицировании кампилобактериями и предопределяло тяжёлое течение инфекционного процесса при заболевании.

Заключение. Учитывая высокую значимость кампилобактериоза и наличие связи между генотипом возбудителя и особенностями иммунного реагирования, целесообразно дальнейшее изучение генотипового состава циркулирующих возбудителей для оценки риска развития тяжёлых форм заболевания и формирования отдалённых осложнений заболевания.

Ключевые слова: кампилобактериоз, цитокины, полногеномное секвенирование ДНК, иммунологический статус

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом при ДНКЦИБ ФМБА (протокол № 11 от 05.03.2019).

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: Лобзин Ю.В., Ермоленко К.Д., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Мартенс Э.А., Полев Д.Е., Ермоленко Е.И. Кампилобактериоз: генотипическая характеристика возбудителя и иммунологический статус пациентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):315–326.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-531>

EDN: <https://www.elibrary.ru/kihkm0>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-531>

Campylobacteriosis : genotypic characteristics of the pathogen and immunological status of patients

Yury V. Lobzin^{1,2}, Konstantin D. Ermolenko¹, Maria A. Makarova^{2,3}, Lidia A. Kaftyreva^{2,3}, Elvira A. Martens^{1,2}, Dmitry E. Polev², Elena I. Ermolenko^{2,4}

¹Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia;

²I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia;

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

⁴Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Campylobacteriosis is among the leading causes of acute gastrointestinal infections. The severity of campylobacteriosis and the development of long-term complications may be influenced by the genotype of the pathogen, whose biological properties can affect immune response parameters.

The **aim of the study** was to identify common genotypes of epidemic clones of *Campylobacter* pathogens and to investigate characteristics of the immune response and severity of the disease.

Materials and methods. The study included 203 patients aged from 1 month to 17 years with campylobacteriosis who underwent treatment at the clinic of the Federal State Budgetary Institution "DNKCIB FMBA" in 2019–2021. The diagnosis was confirmed using polymerase chain reaction method. Patient samples were also analyzed using culture-based methods. Total DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit. Genetic determinants encoding virulence factors and MLST typing were performed using the ResFinder program. The immune status of patients was assessed on days 1 and 7 of the illness. Immunological investigation included measurement of serum immunoglobulin concentrations (IgA, IgM, IgG), C-reactive protein, and cytokines (IL-1 β , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- α , and IFN- γ).

Results. When analyzing the frequency of detection of *Campylobacter* sequence types in children with clinical intestinal infections, it was found that the profile of isolated isolates is most similar to those from countries of North America (USA and Canada), Northern Europe (Great Britain, Holland) and Scandinavia (Denmark, Sweden, Finland). Identification of a pathogen with the *figE*⁺, *cdtA*⁺, *cdtC*⁺ genotype was accompanied by a statistically significant increase in the level of IL-8 and a decrease in the content of IgA in the peripheral blood serum, which reflected the low efficiency of the immune response during infection with *Campylobacter* and predetermined the severe course of the infectious process during the disease.

Keywords: *campylobacteriosis, cytokines, whole-genome DNA sequencing, immune status*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. The research protocol was approved by the Local ethics committee of the Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases (protocol No. 11, March 5, 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: Lobzin Yu.V., Ermolenko K.D., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Martens E.A., Polev D.E., Ermolenko E.I. Campylobacteriosis: genotypic characteristics of the pathogen and immunological status of patients. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):315–326.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-531>

EDN: <https://www.elibrary.ru/kihkm0>

Введение

Бактерии рода *Campylobacter* входят в число ведущих возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ) в развитых странах, превышая в некоторых регионах частоту регистрации сальмонеллёзов и эшерихиозов. В трети случаев они являются причиной «диарей путешественников» у жителей экономически развитых стран, посещающих регионы с высокой степенью циркуляции *Campylobacter* spp. среди населения, животных и в объектах окру-

жающей среды [1]. По последним оценкам ВОЗ, кампилобактериоз (КБ) относится к числу самых распространённых инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи. КБ регистрируют во всех возрастных группах, чаще среди детей в возрасте от 1 года до 3–5 лет; относительное увеличение случаев заболеваний отмечается у детей старшего возраста и молодых людей (по сравнению с другими возрастными категориями). Наибольшее значение в инфекционной патологии человека имеют термо-

фильные *C. jejuni* и *C. coli* [2], которые характеризуются разнообразием генетических детерминант, определяющих патогенетические и клинические особенности заболевания.

В отличие от других возбудителей ОКИ бактериальной природы, термофильные *Campylobacter* spp. относят к числу наиболее трудно культивируемых микроорганизмов, т.к. они требуют особых условий и оборудования. В лабораторной диагностике КБ особо сложной задачей является выделение чистой культуры возбудителя из проб испражнений в связи с их массивной сопутствующей микробной контаминацией. В связи с этим информация о заболеваемости данной инфекцией фрагментарна и не даёт полного представления об истинных масштабах распространения болезни [3, 4]. В последние годы применение молекулярных методов исследования рассматривается не как альтернатива, а как обязательное дополнение к регламентированным схемам диагностики ОКИ, позволяющим быстро и эффективно выявлять возбудителей ОКИ, включая термофильных *Campylobacter* spp. В то же время оно не предполагает видовой идентификации и определения чувствительности к antimикробным препаратам.

Известно, что большинство *Campylobacter* spp. резистентны к действию желчи [5] и обладают способностью колонизировать все отделы кишечника с развитием воспалительных изменений, отёка, гиперплазии слизистой оболочки в месте внедрения и появлением эрозий [6]. Патогенные свойства кампилобактерий во многом определены их подвижностью, способностью к адгезии, инвазии и продукции токсинов. Жгутики кампилобактерий обуславливают их подвижность и перемещение вдоль эпителия [7, 8]. Адгезия и пенетрация энтероцитов способствует деструкции слизистой оболочки кишечника, выраженной воспалительной реакции и развитию геморрагического колита [9]. Тяжёлые формы КБ связывают с продукцией термостабильного и/или термолабильного энтеротоксинов и/или эндотоксина (липополисахарид клеточной стенки), оказывающих влияние на всасываемость жидкости и электролитов, определяя развитие диареи [10].

При эпидемиологическом анализе значительную информативность имеют методы генотипирования *Campylobacter* spp., позволяющие выявлять международные «эпидемические клоны» — вирулентные штаммы, способные к широкому распространению [11]. Изучение доминирующих генотипов кампилобактерий позволит существенно дополнить эпидемиологический мониторинг, представляя важную информацию об источниках инфекции, актуальных факторах передачи, а также оценить масштабы распространения устойчивости к антибактериальным препаратам [12]. Нельзя ис-

ключить также, что определение генотипа возбудителя КБ может способствовать уточнению прогноза тяжести инфекционного процесса и выбору оптимальной схемы лекарственной терапии [13].

Многие исследователи предполагают, что клинические проявления КБ во многом обусловлены иммунным ответом организма [14]. Иммунопатологические реакции предопределяют и многочисленные постинфекционные осложнения, в частности, развитие синдрома Гийена–Барре, реактивного артрита и синдрома раздражённого кишечника [15]. Разнообразие клинических форм и осложнений КБ определяют особый интерес к изучению его патогенеза, включая особенности иммунного реагирования организма при данном заболевании [16, 17]. В то же время тяжесть инфекционного процесса и формирование отдалённых осложнений могут быть обусловлены генотипом возбудителя, биологические свойства которого оказывают влияние на параметры иммунного ответа [18]. Именно поэтому особенности распространения эпидемических клонов, связь генотипа возбудителя с тяжестью течения заболевания и иммунным ответом представляют несомненный интерес.

Целью данного исследования явились обнаружение наиболее распространённых генотипов эпидемических клонов возбудителей КБ и оценка характера иммунного ответа и тяжести заболевания с учётом генотипических особенностей кампилобактерий.

Материалы и методы

В исследование были включены 203 пациента в возрасте от 1 мес до 17 лет (средний возраст $4,8 \pm 1,2$ года) с диагнозом основного заболевания КБ, проходившие лечение в 2019–2021 гг. в клинике ДНКЦИБ ФМБА. Исследование проводили при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Документация и дизайн исследования были утверждены на заседании Локального этического комитета при ДНКЦИБ ФМБА (протокол № 11 от 05.03.2019).

Для оценки тяжести КБ применяли шкалу Кларка, основанную на балльной оценке выраженности и длительности лихорадки, диарейного синдрома, рвоты и общего состояния пациента (табл. 1). Тяжёлой форме КБ соответствовала оценка более 16 баллов.

Диагноз КБ подтверждали на основании результатов исследований проб испражнений методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией с применением набора реагентов «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) для выявления и дифференциации ДНК (РНК) микроорганизмов рода *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp.,

Таблица 1. Шкала Кларка для оценки тяжести ОКИ у детей**Table 1.** Clarke scale for assessing the severity of acute intestinal infections in children

Критерий тяжести Severity criterion	Выраженность проявлений заболевания Severity of disease manifestations		
	1 балл 1 point	2 балла 2 points	3 балла 3 points
Количество дефекаций в день Number of bowel movements per day	2–4	5–7	> 8
Длительность диареи, дни Duration of diarrhea, days	1–4	5–7	> 8
Количество эпизодов рвоты в день Number of vomiting episodes per day	1–3	4–6	> 7
Длительность сохранения рвоты, дни Duration of vomiting, days	2	3–5	> 6
Повышение температуры тела, °C Increase in body temperature, °C	37,1–38,2	38,3–38,7	> 38,8
Длительность сохранения лихорадки, дни Duration of fever, days	1–2	3–4	> 5
Изменения общего состояния Changes general state	Взволнованность или отказ от игры Agitation or refusal to play	Летаргичность или апатия Lethargy or apathy	Судороги или потеря сознания Convulsions or a loss of consciousness
Длительность сохранения патологических поведенческих симптомов, дни Duration of conservation pathological behavioral symptoms, days	1–2	3–4	> 5

Campylobacter spp. (термофильных), *Adenovirus* (группы F), *Rotavirus* (группы A), *Norovirus* (2-го генотипа) и *Astrovirus*. Пробы, в которых уровни флуоресценции соответствовали генетическим детерминантам термофильных *Campylobacter* spp., исследовали культуральным методом согласно МР «Микробиологическая диагностика кампилобактериоза» № 01/15702-8-34. Для выделения штаммов *Campylobacter* spp. использовали питательные среды: Колумбийский агар с содержанием бараньей крови (ООО «Средофф») и угольный агар с селективной добавкой («Oxoid»). Посев на питательные среды проводили с использованием фильтров из ацетата целлюлозы («Sartorius») с диаметром пор 0,45 мкм. Культивирование кампилобактерий осуществляли в микроаэрофильных условиях при 42°C 48 ч с использованием газогенерирующих пакетов CO2GEN («ThermoFisher»).

Для видовой идентификации использовали традиционные рутинные тесты, основанные на определении ключевых фенотипических признаков: морфология клеток и отношение к окраске по методу Грама, продукция цитохромоксидазы и каталазы, гидролиз гиппурата натрия и индоксил-ацетата, а также MALDI-TOF масс-спектрометрия («Bruker Daltonik MALDI Biotyper»).

Тотальную ДНК из бактериальных штаммов выделяли с использованием набора «QIAamp DNA Mini Kit» («Qiagen»). Полногеномное секвенирование ДНК осуществляли с использованием платформ для секвенирования «MiSeq» («Illumina») и DNBSEQ-G50 («MGI») с длиной прочтения

2 × 300 и 2 × 100. Сырые прочтения обрабатывали программой «Trim Galore v. 0.6.7» для удаления последовательностей адаптеров и обрезки по качеству. Контроль качества обработки проводили в программе «FastQC v. 0.11.9». Сборку геномов осуществляли *de novo* с помощью программного обеспечения «SPAdes assembler v. 3.13.1». Результаты сборки оценивали в «QUAST v. 5.2.0». Поиск генетических детерминант, кодирующих факторы вирулентности, и MLST-типирование проводили с помощью платформ онлайн-ресурса Center for Genomic Epidemiology¹.

Исследование иммунного статуса проводили на 1-й и 7-й дни заболевания. Иммунологическое исследование включало определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов (Ig) классов А, М, G, С-реактивного белка, цитокинов: интерлейкина (ИЛ) -1β, -1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, фактора некроза опухоли-α и интерферона-γ. Концентрацию сывороточных IgA, IgM, IgG и цитокинов оценивали при помощи твердофазного иммуноферментного анализа («Вектор-Бест-Балтика»). Фекальный кальпротектин (неинвазивный маркер нейтрофильного интестинального воспаления) в пробах испражнений определяли методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа («R-Biopharm AG»).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica

¹ Center for Genomic Epidemiology.

¹URL: <http://www.genomicsepidemiology.org/services>

for Windows v. 10» («StatSoft»). Количественные показатели оценивали по соответствию нормальному распределению с использованием критериев Шапиро–Уилка (при числе исследуемых менее 50) и Колмогорова–Смирнова (при числе исследуемых более 50). Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, объединяли в вариационные ряды, в которых проводился расчёт средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD). Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывали при помощи значений медианы и нижнего и верхнего квартилей $Me [Q_1; Q_3]$. При сравнении средних величин в нормально распределённых совокупностях количественных данных использовали t -критерий Стьюдента, при сравнении независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального распределения данных — U -критерий Манна–Уитни.

Результаты

Клинические и лабораторные данные

Средний показатель тяжести КБ по шкале Кларка составил $12,6 \pm 1,6$ балла. Тяжесть КБ была оценена как средняя у 156 (76,85%) детей, как тяжёлая — у 35 (17,24%), как лёгкая — у 12 (5,91%). Изменения в гемограмме в 1-е сутки характеризовались нейтрофильным лейкоцитозом в диапазоне $15\text{--}35 \times 10^9$ клеток/л и ускорением СОЭ в диапазоне 20–40 мм/ч. При повторных исследованиях на 7-е сутки у 16 (7,88%) пациентов сохранялись незначительные отклонения параметров гемограмм от нормальных значений. Повышение уровня С-реактивного белка было выявлено у 70,44% пациентов. Установлена сильная положительная корреляционная связь между тяжестью КБ, общим уровнем лейкоцитов ($r = 0,56$; $p = 0,047$) и С-реактивного белка ($r = 0,63$; $p = 0,016$). Анализ уровней фекального кальпротектина выявил тенденцию к его более низкому содержанию в сыворотке крови пациентов со среднетяжёлой формой заболевания, по сравнению с тяжёлой — $120,59 \pm 47,21$ и $242,80 \pm 105,99$ мкг/г соответственно ($p > 0,05$).

Иммунологический статус пациентов с кампилобактериозом

Изучение цитокинового статуса показало, что уровни содержания интерферона- γ и фактора некроза опухоли- α находились в пределах референсных значений и существенно не отличались у пациентов с разными степенями тяжести КБ. Наиболее значимые результаты получены при анализе провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , -6, -8 и регуляторного ИЛ-10 (рис. 1).

В 1-е сутки заболевания повышение уровня ИЛ-1 β выявлено у пациентов со средней и тяжёлой фор-

мами КБ, ИЛ-6 — только при тяжёлой форме. Концентрации этих цитокинов снижались к 7-му дню заболевания, однако лишь показатели ИЛ-6 достигали нормальных референсных значений. Несмотря на то, что уровень ИЛ-8 у пациентов с КБ у значительной части пациентов (44,1%) на 1-е сутки был в пределах референсных значений, отмечалось статистически значимое повышение данного показателя у пациентов с тяжёлой формой КБ по сравнению с остальными детьми ($p = 0,002$). Повышение данного маркера в 1-е сутки заболевания было одним из наиболее значимых предикторов тяжёлого течения КБ ($OR = 7,6 \pm 1,7$; $p < 0,001$). Выявлена сильная корреляционная связь между уровнем ИЛ-8 и тяжестью КБ ($r = 0,781$; $p = 0,006$). К 7-м суткам заболевания этот показатель снижался у всех пациентов, однако при тяжёлом течении КБ оставался значительно выше нормы.

Регуляторный цитокин ИЛ-10 у всех пациентов в 1-й день заболевания не превышал границ референсных значений. В то же время на 7-й день этот показатель существенно превышал норму у пациентов с тяжёлым течением КБ, что может быть объяснено компенсаторной реакцией организма, направленной на предотвращение развития аллергических и аутоиммунных процессов.

Исследование концентраций IgA, IgM и IgG в 1-е сутки заболевания показало, что вне зависимости от тяжести инфекции они находились в пределах референсных значений (рис. 2). К 7-м суткам наблюдалось повышение среднего уровня иммуноглобулинов, статистически значимое для IgA и IgM ($p = 0,003$ и $p = 0,021$ соответственно). Оба класса иммуноглобулинов вырабатываются в острый период иммунного ответа, которые появляются в крови при первом контакте с инфекцией.

Культуральным методом были выделены термотолерантные *Campylobacter* spp. в 48 из 203 исследованных проб испражнений от 28 детей с гастроэнтеритическим и 20 с энтероколитическим вариантами КБ, из них у 6 (12,50%) заболевание протекало в лёгкой степени, у 30 (62,50%) — в средней и у 12 (25,00%) — тяжёлой. При видовой идентификации установлено, что 32 штамма принадлежали к роду *C. jejuni*, 16 штаммов — *C. coli*.

Частота обнаружения генов вирулентности кампилобактерий

Ключевые гены вирулентности, ответственные за хемотаксис, адгезию и колонизацию, инвазию, морфогенез жгутиков и капсулы, продукцию токсинов и сидерофоров, присутствовали во всех выделенных штаммах *C. jejuni* и *C. coli* (табл. 2).

Анализ патогенетически значимых генетических детерминант показал, что гены, ассоциированные с подвижностью (*flaA*, *flaB*, *flhA*, *flhB*, *flgB*, *flgE*, *fliM*, *fliY*), адгезий (*cadF*, *dnaJ*, *jlpA*, *pldA*, *racR*,

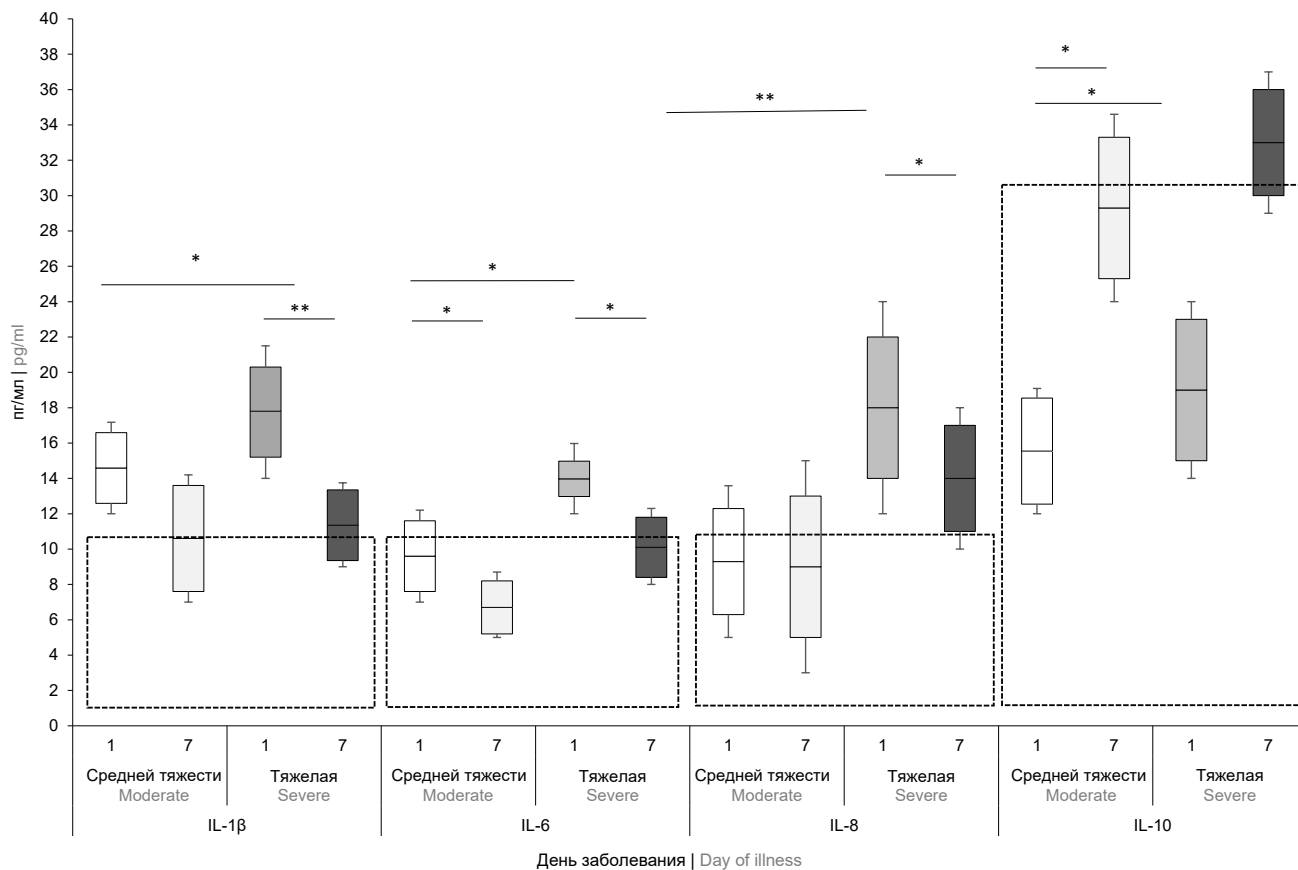


Рис. 1. Концентрация цитокинов в сыворотке крови детей при средней тяжести и тяжелой формах КБ на 1-е и 7-е сутки заболевания ($n = 42$).

Здесь и на рис. 2: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Рамкой выделены референсные значения.

Fig. 1. Concentration of cytokines in the blood serum of children with moderate and severe forms of campylobacteriosis on days 1 and 7 of the disease ($n = 42$).

Here and in Fig. 2: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Reference values are highlighted by a frame.

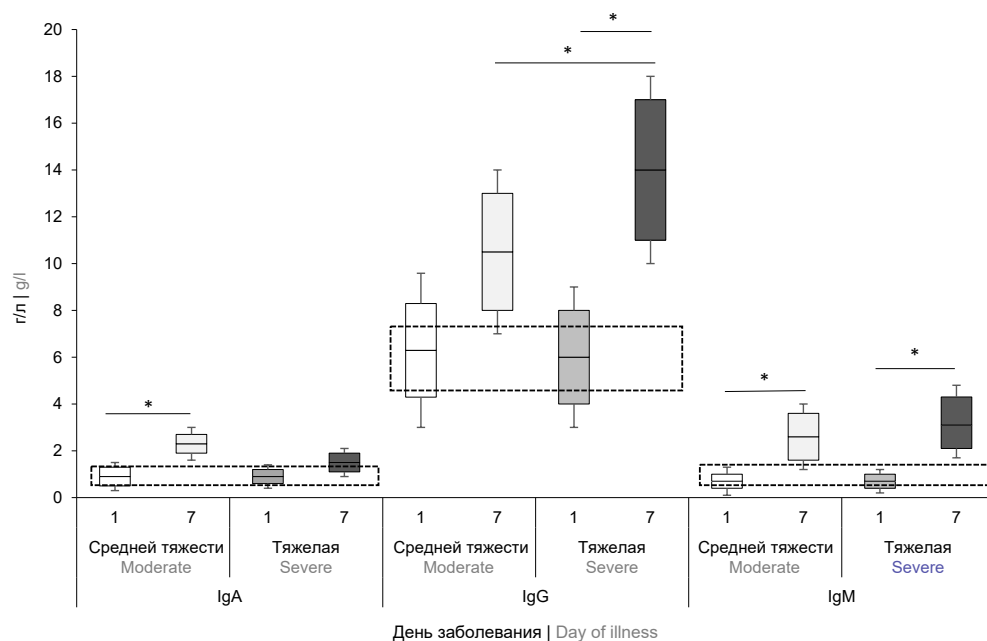


Рис. 2. Динамика уровня сывороточных иммуноглобулинов при КБ у детей ($n = 46$).

Fig. 2. Dynamics of the level of serum immunoglobulins in children with campylobacteriosis ($n = 46$).

Таблица 2. Частота выявления генов вирулентности в штаммах *Campylobacter* spp.
Table 2. Frequency of detection of virulence genes in *Campylobacter strains* spp.

Гены и факторы вирулентности Genes and factors virulence	<i>C. jejuni</i> (n = 32)		<i>C. coli</i> (n = 16)		p	Всего (n = 48) Total (n = 48)	
	n	%	n	%		n	%
Подвижность Mobility							
<i>flaA</i>	32	100,00	16	100,00	0,05	48	100,00
<i>flaB</i>	16	50,00	14	87,50	0,011	30	62,50
<i>flhA</i>	28	87,50	12	75,00	0,05	40	83,33
<i>flhB</i>	30	93,75	14	87,50	0,05	44	91,67
<i>flgB</i>	32	100,00	16	100,00	0,05	48	100,00
<i>flgE</i>	25	78,13	16	100,00	0,05	41	85,42
<i>fliM</i>	32	100,00	16	100,00	0,05	48	100,00
<i>fliY</i>	32	100,00	16	100,00	0,05	48	100,00
Адгезия Adhesion							
<i>cadF</i>	29	90,63	12	75,00	0,05	41	85,42
<i>dnaJ</i>	32	100,00	16	100,00	0,05	48	100,00
<i>jlpa</i>	20	62,50	7	43,75	0,05	27	56,25
<i>pldA</i>	22	68,75	7	43,75	0,05	29	60,42
<i>racR</i>	28	87,50	12	75,00	0,05	40	83,33
<i>virB11</i>	11	34,38	5	31,25	0,05	16	33,33
Хемотаксис Chemotaxis							
<i>cheA</i>	30	93,75	16	100,00	0,05	46	95,83
<i>cheB</i>	31	96,88	13	81,25	0,05	44	91,67
<i>cheR</i>	24	75,00	12	75,00	0,05	36	75,00
<i>cheW</i>	30	93,75	10	62,50	0,0062	40	83,33
<i>cheY</i>	31	96,88	15	93,75	0,05	46	95,83
<i>cheZ</i>	28	87,50	9	56,25	0,015	37	77,08
Инвазия Infestation							
<i>iamA</i>	29	90,63	15	93,75	0,05	44	91,67
<i>ciaB</i>	29	90,63	13	81,25	0,05	42	87,50
<i>ceuE</i>	24	75,00	16	100,00	0,05	40	83,33
Токсины Toxins							
<i>cdtA</i>	20	62,50	10	55,56	0,05	30	62,50
<i>cdtB</i>	32	100,00	16	100,00	0,05	48	100,00
<i>cdtC</i>	21	65,63	12	75,00	0,05	33	68,75
<i>wlaN</i>	4	12,50	2	12,50	0,05	6	12,50
Капсула Capsule							
<i>kpsM</i>	29	90,63	13	81,25	0,05	42	87,50
Сидерофоры Siderophores							
<i>cfrA</i>	27	84,38	11	68,75	0,05	38	79,17
<i>Fur</i>	30	93,75	14	87,50	0,05	44	91,67

virB11), колонизацией (*cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*), инвазией (*iamA*, *ciaB*, *ceuE*), синтезом токсинов (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*), капсулы (*kpsM*) и сидерофоров (*cfrA*, *Fur*) без статистически значимых различий встречались в штаммах *C. jejuni* и *C. coli* независимо от видовой принадлежности.

Распространённость генов, кодирующих синтез флагеллина жгутиков, по суммарным данным колебалась от 62,50% (*flaB*) до 100% (*flaA*, *flgB*, *fliM*, *fliY*). Анализ результатов детекции генов, ассоциированных с адгезией, показал, что все штаммы содержали ген *dnaJ*. Статистических различий

в присутствии генетических детерминант, кодирующих способность к хемотаксису выявлено не было. Все штаммы характеризовались наличием гена *cdtB*, ответственного за продукцию цитолетального токсина, участвующего в подавлении пролиферации энтероцитов с последующей их гибелью. Ассоциированные с инвазией гены *iamA*, *ciaB*, *ceuE* были выявлены у 91,67, 87,50, 83,33% штаммов *Campylobacter* spp. соответственно. Анализ присутствия генетических детерминант вирулентности, кодирующих синтез капсулы и сидерофоров, не выявил достоверных различий в штаммах *C. jejuni* и *C. coli*.

Установлено, что у пациентов с тяжёлым течением КБ в 83,3% случаев штаммы *Campylobacter* spp. характеризовались генотипом вирулентности *flgE*⁺, *cdtA*⁺ и *cdtC*⁺. По данным многофакторного анализа, данный генотип повышает вероятность тяжёлого течения КБ в 12,57 [3,159; 50,019] раза ($p < 0,001$).

Типы сиквенсов кампилобактерий и их географическое распространение

Филогенетический анализ показал, что некоторые штаммы, отнесённые к виду *C. jejuni*, образовали отдельную генетически обособленную группу. У 8 штаммов некоторые аллели, принадлежащие таксономическому кластеру *C. jejuni*, были обнаружены также у *C. coli* и наоборот, что вызвано генетической мозаикой, встречающейся внутри рода.

Проведено сравнение разнообразия конституциональных генов *C. coli* и *C. jejuni*. Среди 32 штаммов *C. jejuni* методом мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) было обнаружено 18 различных последовательностей МЛСТ, которые были сортированы на 12 различных комплексов. Географическое распространение выявленных генотипов в других регионах мира представлено в **табл. 3**.

При сопоставлении типов сиквенсов кампилобактерий, выделенных у пациентов, и данных международных баз данных было показано, что сходные сиквенс-типы наиболее распространены в странах Северной Америки (США и Канада), Северной Европы (Великобритания, Голландия) и Скандинавии (Дания, Швеция, Финляндия). Среди 16 штаммов *C. coli* было обнаружено 10 различных типов последовательностей МЛСТ. Максимально представлены различные типы сиквенсов в Великобритании, Голландии и Люксембурге. Характер географического распространения выделенных *C. jejuni* и *C. coli* у пациентов в проведённом исследовании имел целый ряд сходств, в частности, отмечалось доминирование сиквенс-типов, наиболее распространённых в Северной Европе. Тесные социально-экономические связи и географическая близость представленных стран создают предпосылки для реализации многообразных путей передачи возбудителя, что, вероятно, и объясняет подобное распределение.

Обсуждение

Противоречия и отсутствие согласованности данных по формам заболевания и тяжести течения связаны с патогенным потенциалом возбудителя и различиями в иммунном реагировании. Предшествующие исследования продемонстрировали высокую консервативность жгутиковых генов, являющихся критически значимыми факторами вирулентности [19, 20], обеспечивающими колонизацию и выживание кампилобактерий [21]. Жгутики необходимы для сопротивления перистальтике кишечника, которая в противном случае могла бы вытеснить микроорганизм из желудочно-кишечного тракта [22]. Жгутиковая нить состоит из белка флагеллина, который кодируется двумя соседними генами: *flaA* и *flaB*. В работах L. Koelman и соавт. было показано, что *flaB*-отрицательные кампилобактерии демонстрируют частичную подвижность и могут сохранять жизнеспособность [23]. Однако в ряде других исследований имелись данные, что отсутствие *flaB* снижало колонизационную способность и вирулентность возбудителя [24]. Стоит также отметить, что отсутствие *flaB* достоверно чаще выявлялось у изолятов *C. jejuni* по сравнению с *C. coli*.

Гены *flhA* и *flhB*, участвующие в сборке жгутиков, по данным L. Koelman и соавт., критически необходимы для инвазии [25]. Среди изолятов в данном исследовании не выявлено ни одного штамма, у которого отсутствовали бы оба гена одновременно, что частично подтверждает данную гипотезу.

При анализе частоты выявления генов вирулентности обращало на себя внимание редкое обнаружение генов *virB11* и *wlaN*. Ген *virB11* кодирует гены, отвечающие за адгезию к энтероцитам [25]. По данным D. Vascon и соавт., выявление гена *virB11* приводило к резкому возрастанию способности к адгезии по сравнению со штаммами дикого типа [26]. Аналогичным образом ген *wlaN*, кодирующий b-1,3-галактозилтрансферазу, участвующую в синтезе клеточной стенки, многократно повышает способность кампилобактерий к закреплению на поверхности кишечного эпителия [27]. По всей видимости, частое выявление изолятов, не содержащих эти гены, свидетельствует об их вспомогательной роли, а их отсутствие не приводит к значительному снижению вирулентности.

Ген *wlaN* в ряде публикаций рассматривается как ключевой триггер иммунопатологических реакций, в частности, запускающий развитие аутоиммунных полирадикуллопатий [28]. Его низкая распространённость в исследуемой группе может частично объяснить отсутствие большого количества сообщений о подтверждённых случаях синдрома Гейна–Барре у детей после КБ в России.

Ген каталазы *katA* был выявлен у 78% изолятов. Данный ген способствует защите *Campylobacter* spp.

Таблица 3. Распространение типов сиквенсов и кор-геномных типов сиквенсов *S. jejuni* в различных странах (n = 32)
Table 3. Distribution of sequence types and core-genomic sequence types *S. jejuni* in various countries (n = 32)

Номер штамма Strain number	Сиквенс-тип Sequence type	Дания Denmark	Великобритания UK	Голландия Holland	Австралия Australia	США USA	Канада Canada	Испания Spain	Норвегия Norway	Люксембург Luxembourg	Япония Japan	Уругвай Uruguay	Китай China	Бельгия Belgium	Франция France	Финляндия Finland	Швеция Sweden	Чехия Czech Republic	
E10796	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10797	137	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10798	38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10800	48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10801	3503	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10802	49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10803	52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10804	2100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10805	61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10806	122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10807	206	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10808	353	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10809	524	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10810	354	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10811	443	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10812	584	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10813	824	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10814	305	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. «+» — присутствие; «-» — отсутствие *S. jejuni* в данной стране.
Note. «+» — presence; «-» — absence of *S. jejuni* in a given country.

от окислительного стресса, повышает выживаемость внутри макрофагов. Одновременно наличие данного гена приводит к возрастанию устойчивости к воздействию антибактериальных препаратов [29]. Гены поглощения железа (*cfrA* и *fur*) также присутствовали в большинстве изолятов (79,17 и 91,67% соответственно).

В группе с тяжёлым течением КБ уровень IgA был статистически значимо меньше, чем при среднетяжёлом ($p = 0,024$). Нельзя исключить, что дефицит IgA отрицательно сказывается на течении заболевания вследствие недостаточной нейтрализации токсинов возбудителя. Повышение уровня IgG, составляющих 75–80% антител в плазме, обеспечивающего длительную гуморальную защиту от повторного инфицирования, на фоне отмечалось только у пациентов с КБ тяжёлой степени ($p = 0,039$). Очевидно, у этих пациентов элиминация кампилобактерий из организма запаздывала, что приводило к более длительной и массивной стимуляции иммунного ответа антигенами возбудителя. Ещё одним предиктором тяжёлого течения КБ оказалось повышение уровня ИЛ-8. ИЛ-8 рассматривается в качестве ключевого триггера неспецифической иммунной защиты, являясь хемоаттрактантом, воздействующим главным образом на нейтрофилы и моноциты [14]. Несомненное прогностическое значение продемонстрировала и оценка динамики уровня ИЛ-8. Длительное сохранение повышения данного маркера выступало в качестве прогностически неблагоприятного фактора и часто наблюдалось при затяжном течении заболевания. Обращало на себя внимание, что генотип возбудителя *flgE*⁺, *cdtA*⁺, *cdtC*⁺ чаще выявляли при тяжёлом течении КБ при наличии значительных отклонений в параметрах иммунного реагирования, что, возможно, является дополнительной предпосылкой к тяжёлому течению заболевания. Анализ иммунологических параметров течения КБ с генотипом возбудителя *flgE*⁺, *cdtA*⁺, *cdtC*⁺ позволил выявить статистически значимые отличия в уровне ИЛ-8 (0,013) и IgA ($p = 0,021$) в 1-е сутки заболевания по сравнению с пациентами, у которых выявлялись другие генотипы возбудителей.

Выводы

Таким образом, при анализе частоты распространённости сиквенс-типов кампилобактерий, выявленных у детей с клиникой кишечной инфекции, было установлено, что наиболее схожим является профиль выделяемых изолятов в странах Северной Америки (США и Канада), Северной Европы (Великобритания, Голландия) и Скандинавии (Дания, Швеция, Финляндия). Дети с инфекцией, вызванной *S. coli* и *S. jejuni* с генотипом *flgE*⁺, *cdtA*⁺, *cdtC*⁺, имели ряд клинических отличий в течении инфекционного процесса от пациентов другими геноти-

пами возбудителя. Выявление *Campylobacter* spp. с генотипом *flgE*⁺, *cdtA*⁺, *cdtC*⁺ в 1-е сутки заболевания сопровождается более частым повышением уровня ИЛ-8 и понижением содержания IgA в сыворотке периферической крови, что может свидетельствовать о недостаточной эффективности иммунного ответа при инфицировании кампилобактериями данного генотипа. Нельзя исключить, что выявленные особенности иммунного реагирования при инфицировании кампилобактериями с генотипом *flgE*⁺, *cdtA*⁺, *cdtC*⁺ лежат в основе длительного сохранения симптомов заболевания и увеличения тяжести заболевания. Учитывая высокую социальную и клиническую значимость КБ, целесообразно дальнейшее изучение генотипового состава циркулирующих возбудителей для оценки риска развития тяжёлых форм заболевания и формирования отдалённых осложнений заболевания.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Hameed A., Woodacre A., Machado L.R., Marsden G.L. An updated classification system and review of the lipooligosaccharide biosynthesis gene locus in *Campylobacter jejuni*. *Front. Microbiol.* 2020;11:677. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00677>
- Потапова Т., Ермоленко К., Холин А. и др. Заболеваемость острыми кишечными инфекциями в Санкт-Петербурге на фоне пандемии COVID-19. *Журнал инфектологии.* 2022; 14(3):37–44. Potapova T.V., Ermolenko K.D., Kholin A., et al. Incidence of acute intestinal infections in Saint Petersburg during COVID-19 pandemic. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-3-37-44> EDN: <https://elibrary.ru/kikypp>
- Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Man S.M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015;28(3):687–720. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00006-15>
- Климова О., Гончар Н., Раздьяконова И., Лобзин Ю. Этиологические и эпидемиологические особенности инфекционных гемоколитов у госпитализированных пациентов детского возраста. *Журнал инфектологии.* 2021;13(1):86–92. Klimova O.I., Gonchar N.V., Razd'yakonova I.V., Lobzin Yu.V. Etiological and epidemiological characteristics of infectious hemocolitis in hospitalized pediatric patients. *Journal Infectology.* 2021;13(1):86–92. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-1-86-92> EDN: <https://elibrary.ru/jxnncq>
- Жданов К.В., Захаренко С.М., Львов Н.И., Козлов К.В. Противодействие инфекциям в эпоху современных угроз. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение.* 2017; (6):85–91. Zhdanov K.V., Zakharenko S.M., Lvov N.I., Kozlov K.V. Counteracting infections in the age of current threats. *Infectious Diseases: News, Views, Education.* 2017;(6): 85–91. EDN: <https://elibrary.ru/zvghkz>
- Sher A.A., Ashraf M.A., Mustafa B.E., Raza M.M. Epidemiological trends of foodborne *Campylobacter* outbreaks in the United States of America, 1998–2016. *Food Microbiology.* 2021;97:103751. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103751>
- Dos Santos F.M.S., Low K.H., Chai L.C. Thermophilic and non-thermophilic *Campylobacter* species emits distinct volatile organic compounds in different culture media and growth phases. *Res. Square.* 2022. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1247479/v1>

8. Callahan S.M., Dolislager C.G., Johnson J.G. The host cellular immune response to infection by *Campylobacter* spp. and its role in disease. *Infect. Immun.* 2021;89(8):e0011621. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00116-21>
9. Kemper L., Hensel A. *Campylobacter jejuni*: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2023;107(9):2725–54. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12456-w>
10. Tegtmeier N., Sharafutdinov I., Harrer A., et al. *Campylobacter* virulence factors and molecular host–pathogen interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2021;431:169–202. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-65481-8_7
11. Wassenaar T.M. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10(3):466–76. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.466>
12. Lopes G.V., Ramires T., Kleinubing N.R., et al. Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microb. Pathog.* 2021;161(Pt. A):105265.13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105265>
13. Newby T.J. Protective immune responses in the intestinal tract. In: Newby T.J., Stokes C.R. Local Immune Responses of the Gut. Boca Raton;2019:143–98. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780429279508>
14. Жданов К., Яременко М., Финогеев Ю., Захаренко С. Иммуно-патогенетические аспекты лихорадки у инфекционных больных. *Журнал инфектологии.* 2014;5(1):5–17. Zhdanov K.V., Yaremenko M.V., Finogeev Yu.P., Zakharenko S.M. Clinical and pathogenetic aspects of fever in patients with infectious diseases. *Journal Infectology.* 2014;5(1):5–17. EDN: <https://elibrary.ru/redmqr>
15. Goni M., Muhammad I., Goje M., et al. *Campylobacter* in dogs and cats; its detection and public health significance: a review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2017;5(6):239–48. DOI: <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2017/5.6.239.248>
16. Савиных М.В., Калужских Т.И., Савиных Н.А., Егорова Т.В. Клинико-эпидемиологические аспекты сальмонеллеза и кампилобактериоза у детей. *Журнал инфектологии.* 2020;12(4 S1):97. Savinykh M.V., Kaluzhskikh T.I., Savinykh N.A., Egorova T.V. Clinical and epidemiological aspects of salmonellosis and campylobacteriosis in children. *Journal Infectology.* 2020;12(4 S1):97. EDN: <https://elibrary.ru/ruwekh>
17. Горелов А.В. Кампилобактериоз у детей. *Инфекционные болезни.* 2004;2(3):80–2. Gorelov A.V. Campylobacteriosis in children. *Infectious Diseases.* 2004;2(3):80–2. EDN: <https://elibrary.ru/iadkjk>
18. Shahreza M.S., Dehkordi N.G., Nassar M.F., Al-Saedi R. Genotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from raw meat of animal species. *Acad. J. Health Sci. Medicina Balear.* 2022;47(4):52–7.
19. Strakova N., Michova H., Shagieva E., et al. Genotyping of *Campylobacter jejuni* and prediction tools of its antimicrobial resistance. *Folia Microbiol. (Praha).* 2024;69(1):207–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01093-5>
20. Peters S., Pascoe B., Wu Z., et al. *Campylobacter jejuni* genotypes are associated with post-infection irritable bowel syndrome in humans. *Commun. Biol.* 2021;4(1):1015. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02554-8>
21. Datta S., Niwa H., Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 2003;52(Pt. 4):345–8. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05056-0>
22. Müller J., Schulze F., Müller W., Hänel I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet. Microbiol.* 2006;113(1-2):123–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.029>
23. Jones M.A., Marston K.L., Woodall C.A., et al. Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 to high-level colonization of the avian gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 2004;72(7):3769–76. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.72.7.3769-3776.2004>
24. Hendrixson D.R., DiRita V.J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol. Microbiol.* 2004;52(2):471–84. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03988.x>
25. Koolman L., Whyte P., Burgess C., Bolton D. Virulence gene expression, adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* exposed to oxidative stress (H₂O₂). *Int. J. Food Microbiol.* 2016;220:33–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.002>
26. Konkel M.E., Klena J.D., Rivera-Amill V., et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* 2004;186(11):3296–303. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.186.11.3296-3303.2004>
27. Koolman L., Whyte P., Burgess C., Bolton D. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 2015;12(5):424–32. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1883>
28. Bacon D.J., Alm R.A., Burr D.H., et al. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* 2000;68(8):4384–90. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.68.8.4384-4390.2000>
29. Talukder K.A., Aslam M., Islam Z., et al. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(4):1485–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01912-07>
30. Guirado P., Paytubi S., Miró E., et al. Differential distribution of the wlaN and cgtB genes, associated with Guillain-Barré syndrome, in *Campylobacter jejuni* isolates from humans, broiler chickens, and wild birds. *Microorganisms.* 2020;8(3):325. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030325>
31. Hwang S., Ryu S., Jeon B. Roles of the superoxide dismutase SodB and the catalase KatA in the antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni*. *J. Antibiot. (Tokyo).* 2013;66(6):351–3. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2013.20>

Информация об авторах

Лобзин Юрий Владимирович — д.м.н., профессор, академик РАН, Президент ДНКЦИБ ФМБА, Санкт-Петербург, Россия; зав. каф. инфекционных болезней СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6934-2223>

Ермоленко Константин Дмитриевич[✉] — к.м.н., зав. научно-исследовательского отдела кишечных инфекций ДНКЦИБ ФМБА, Санкт-Петербург, Россия, ermolenko.kd@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1730-8576>

Макарова Мария Александровна — д.м.н., в.н.с., зав. лаб. кишечных инфекций НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент каф. медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Information about the authors

Yury V. Lobzin — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Full Member, President, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia; Head, Department of infection diseases, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6934-2223>

Konstantin D. Ermolenko[✉] — Cand. Sci. (Med.), Head, Research department of intestinal infections, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia, ermolenko.kd@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1730-8576>

Maria A. Makarova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Department of intestinal infections, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia; Associate Professor, Department of medical microbiology, I.I. Mechnikov North-

Кафтырева Лидия Алексеевна — д.м.н., в.н.с. группы эпидемиологии брюшного тифа НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор каф. медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0989-1404>

Мартенс Эльвира Акрамовна — к.м.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ДНКЦИБ ФМБА, Санкт-Петербург, Россия; ассистент кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6093-7493>

Полев Дмитрий Евгеньевич — к.б.н., с.н.с. группы метагеномных исследований НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9679-2791>

Ермоленко Елена Игоревна — д.м.н., зав. лаб. молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор каф. медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2569-6660>

Участие авторов: *Лобзин Ю.В.* — написание статьи, работа с источниками литературы; *Ермоленко К.Д.* — работа с пациентами, сбор биологического материала, анализ данных, разработка базы данных, написание статьи, работа с источниками литературы; *Макарова М.А.* — сбор данных, написание статьи, работа с источниками литературы; *Кафтырева Л.А.* — сбор данных, написание статьи, работа с источниками литературы; *Полев Д.Е.* — сбор данных, анализ баз данных; *Мартенс Э.А.* — сбор данных, проведение лабораторных исследований, выделение культур кампилобактерий, написание статьи, работа с источниками литературы; *Ермоленко Е.И.* — сбор данных, написание статьи, работа с источниками литературы. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 12.03.2024;
принята к публикации 12.05.2024;
опубликована 29.06.2024

Western State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Lidia A. Kaftyreva — D. Sci. (Med.), leading researcher, Typhoid epidemiology group, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; Professor, Department of medical microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0989-1404>

Elvira A. Martens — Cand. Sci. (Med.), Head, Clinical diagnostic laboratory, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia; Assistant Professor, Department of medical microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6093-7493>

Dmitry E. Polev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Metagenomic research group, Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9679-2791>

Elena I. Ermolenko — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of molecular microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; Professor, Department of medical microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2569-6660>

Author contribution: *Lobzin Yu.V.* — article writing, work with literature sources; *Ermolenko K.D.* — work with patients, collection of biological material, data analysis, database development, article writing, work with literature sources; *Makarova M.A.* — data collection, article writing, work with literature sources; *Kaftyreva L.A.* — data collection, article writing, work with literature sources; *Polev D.E.* — data collection, database analysis; *Martens E.A.* — data collection, laboratory research, isolation of campylobacter cultures, article writing, work with literature sources; *Ermolenko E.I.* — data collection, article writing, work with literature sources. 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 12.03.2024;
accepted for publication 12.05.2024;
published 29.06.2024



Изменения этиологической структуры тяжёлых острых респираторных вирусных инфекций у детей и взрослых под влиянием пандемии COVID-19

Соминина А.А.¹✉, Даниленко Д.М.¹, Комиссаров А.Б.¹, Писарева М.М.¹, Мусаева Т.Д.¹, Столяров К.А.¹, Афанасьева О.И.¹, Тимонина В.С.², Венев Е.В.¹, Леванюк Т.П.¹, Смородинцева Е.А.¹, Курская О.Г.³, Шестопалов А.М.³, Леленкова Е.В.⁴, Семенов А.В.⁴, Лиознов Д.А.^{1,5}

¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;

²Детская городская больница Святой Ольги, Санкт-Петербург, Россия;

³Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия;

⁴Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия;

⁵Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Традиционная система надзора за гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями даёт общую характеристику эпидемий, но не обеспечивает получение информации по возрастным особенностям этиологии и клиники тяжёлых острых респираторных заболеваний (ТОРИ) у госпитализированных больных

Цель работы — провести мониторинг этиологии ТОРИ у госпитализированных детей и взрослых с оценкой влияния на этот процесс пандемии COVID-19.

Материалы и методы. Стандартизованный клиничко-лабораторный мониторинг ТОРИ среди 18 458 госпитализированных больных проведён в стационарах 3 городов России с еженедельной детекцией 11 типов возбудителей с помощью полимеразной цепной реакции.

Результаты. По данным обследования госпитализированных больных с ТОРИ за 2018–2023 гг. вирусная этиология респираторных заболеваний была расшифрована в 58,3% случаев. Еженедельный мониторинг показал изменение этиологической мозаики возбудителей ТОРИ в период пандемии COVID-19 с резким снижением частоты детекции вирусов гриппа и респираторно-синцитиального вируса (РСВ) в сезон 2020–2021 гг. на фоне достоверного роста у детей метапневмовирусной и риновирусной инфекций. В сезон 2022–2023 гг. отмечен рост удельного веса РСВ-инфекции у детей в возрасте до 6 лет (до 36,2%) на фоне достоверного снижения частоты COVID-19. В отделениях реанимации и интенсивной терапии у детей в постпандемический период чаще всего (до 30,1–53,6% от числа положительных случаев, $p < 0,001$) выявляли РСВ-инфекцию, у взрослых — SARS-CoV-2 (76,5–100% случаев, $p < 0,001$).

Заключение. Данные Госпитального надзора существенно дополняют эпидемиологическую информацию, получаемую в традиционной системе надзора. Мониторинг инфекций показал непрерывно меняющуюся этиологическую инфраструктуру ТОРИ с исчезновением гриппа и РСВ в период пандемии COVID-19 и их возвращением в циркуляцию в постпандемический период.

Ключевые слова: *грипп, парагрипп, SARS-CoV-2, COVID-19, респираторно-синцитиальный вирус, риновирусы, аденовирусы, метапневмовирус, этиология, надзор, стационар*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протоколы исследования одобрены Этическим комитетом НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (протоколы № 194 от 12.12.2022, № 178 от 10.01.2022, № 161 от 14.12.2020, № 149 от 18.12.2019, № 136 от 21.12.2018, № 3120 от 18.12.2017).

Благодарность. Авторы статьи выражают благодарность экс-директору Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций к.м.н. А.В. Алимову за участие в организации работ по госпитальному надзору в Екатеринбурге (2018–2020 гг.), а также м.н.с М.Ю. Бакаеву и м.н.с. В.В. Гончару за контроль правильности заполнения Индивидуальных карт больных и ввод данных ПЦР-диагностики в электронную базу данных НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева.

Источник финансирования: Министерство здравоохранения Российской Федерации (темы НИР Государственного задания: 1. Разработка и апробация методики госпитального надзора за гриппом и другими ОРВИ в целях выявления факторов риска формирования тяжёлых форм острых респираторных инфекций в условиях крупного мегаполиса (2018–2020), Рег. № НИОКТР АААА-А18-118022790102-7; 2. Формирование комплексной системы надзора за гриппом и другими ОРВИ на основе совершенствования инфраструктуры клиничко-эпидемиологического анализа, молекулярной диагностики и генетической характеристики возбудителей (2021–2023) Рег. № НИОКТР 121051900143-7 при поддержке со стороны Фонда по эпидемиологии Франции («Fondation

pur l'épidémiologie de la grippe», France), Уведомления: № Engt: 00079655 от 13.11.2017; № Engt: 00090223 от 21.11.2018; № Engt: 00100527 от 22.11.2019; № Engt: 00111470 от 25.11.2020; № 00123945/EF-2021-19956 от 29.12.2021).

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

Для цитирования: Соминина А.А., Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Мусаева Т.Д., Столяров К.А., Афанасьева О.И., Тимонина В.С., Венев Е.В., Леванюк Т.П., Смородинцева Е.А., Курская О.Г., Шестопалов А.М., Леленкова Е.В., Семенов А.В., Лioзнов Д.А. Изменения этиологической структуры тяжёлых острых респираторных вирусных инфекций у детей и взрослых под влиянием пандемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):327–341.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-532>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-532>

Changes in the etiological structure of severe acute respiratory viral infections in children and adults under the influence of the COVID-19 pandemic

Anna A. Sominina¹✉, Darya M. Danilenko¹, Andrey B. Komissarov¹, Maria M. Pisareva¹, Tamila D. Musaeva¹, Kirill A. Stolyarov¹, Olga I. Afanasyeva¹, Veronika S. Timonina², Evgeny V. Venev¹, Tatiana P. Levanyuk¹, Elizaveta A. Smorodintseva¹, Olga G. Kurskaya³, Alexander M. Shestopalov³, Evgenya V. Lelenkova⁴, Alexander V. Semenov⁴, Dmitry A. Lioznov^{1,5}

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia;

²St. Olga Children's City Hospital, St. Petersburg, Russia;

³Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia;

⁴Federal Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia;

⁵First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. The traditional surveillance system for influenza and ARVI provides a general description of epidemics, but does not provide information on the age-related characteristics of the etiology and clinical peculiarities of severe acute respiratory diseases (SARI) in hospitalized patients.

Aim. To monitor the etiology of SARI in hospitalized children and adults, assessing the impact of the COVID-19 pandemic on this process.

Materials and methods. Standardized clinical and laboratory monitoring of SARI among 18,458 hospitalized patients was carried out in hospitals in three cities of Russia with weekly PCR detection of 11 types of pathogens.

Results. According to the investigation of hospitalized patients with SARI for the period from 2018 to 2023, the viral etiology of respiratory diseases was deciphered in 58.3% of cases. Weekly monitoring showed a change in the etiological mosaic of SARI pathogens during the SARS-CoV-2 pandemic with a sharp decrease in the frequency of detection of influenza and respiratory syncytial virus (RSV) during the 2020–2021 season against the background of a significant increase of metapneumovirus and rhinovirus infections in children. During the 2022–2023 season an increase in the proportion of RSV infection in children under 6 years of age (up to 36.2%) was noted against the background of a significant decrease in the frequency of SARS-CoV-2. In the intensive care units (ICU), RSV infection was most often in children during the post-pandemic period (up to 30.1–53.6% of positive cases, $p < 0.001$); in adults, SARS-CoV-2 was mostly detected (76.5–100% of cases, $p < 0.001$).

Conclusion. Hospital surveillance data significantly complements the epidemiological information obtained in the traditional surveillance system. Monitoring of infections has shown a continuously changing etiological infrastructure of SARI, with the disappearance of influenza and RSV during the COVID-19 pandemic and their return to circulation in the post-pandemic period.

Keywords: influenza, parainfluenza, SARS-CoV-2, COVID-19, respiratory syncytial virus, rhinoviruses, adenoviruses, metapneumovirus, etiology, surveillance, hospital

Ethics approval. The study was conducted with the voluntary informed consent of the patients or their legal representatives. The study protocols were approved by the Ethics Committee of the Smorodintsev Research Institute of Influenza (protocols No. 194, dated December 12, 2022; No. 178, dated January 10, 2022; No. 161, dated December 14, 2020; No. 149, dated December 18, 2019; No. 136, dated December 21, 2018; No. 3120, dated December 18, 2017).

Acknowledgement. The authors of this article express their gratitude to the ex-director of the Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Candidate of Medical Sciences A.V. Alimov for participation in the organization of hospital surveillance work in Ekaterinburg (2018–2020), as well as to M.Y. Bakaev, M.Sc. and M.Sc. V.V. Gonchar for control over the correctness of filling in the individual patient records and entering PCR diagnostics data into the electronic database of the A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza (A.A. Smorodintsev).

Funding source: Ministry of Health of the Russian Federation (Research topics of the State assignments: 1. Development and testing of methods for hospital surveillance of influenza and other acute respiratory viral infections in order to identify risk factors for the formation of severe forms of acute respiratory infections in a large megapolis (2018–2020), Reg. No. NIOKTR AAAA-A18-118022790102-7; 2. Formation of a comprehensive surveillance system for influenza and other acute respiratory viral infections based on improving the infrastructure of clinical and epidemiological analysis, molecular diagnostics and genetic characteristics of pathogens (2021–2023) Reg. No. NIOKTR 121051900143-7, with the support of the French Epidemiology Foundation (“Fondation pur l’epidemiologie de la grippe”, France), Notifications: No. Engt: 00079655, dated 13.11.2017; No. Engt: 00090223, dated 21.11.2018; No. Engt: 00100527, dated 22.11.2019; No. Engt: 00111470, dated 25.11.2020; No. 00123945/EF-2021-19956, dated 29.12.2021).

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

For citation: Sominina A.A., Danilenko D.M., Komissarov A.B., Pisareva M.M., Musaeva T.D., Stolyarov K.A., Afanasyeva O.I., Timonina V.S., Venev E.V., Levanyuk T.P., Smorodintseva E.A., Kurskaya O.G., Shestopalov A.M., Lelenkova E.V., Semenov A.V., Lioznov D.A. Changes in the etiological structure of severe acute respiratory viral infections in children and adults under the influence of the COVID-19 pandemic. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):327–341.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-532>
EDN: <https://www.elibrary.ru/jmtwkj>

Введение

Несмотря на достигнутый прогресс в области надзора за гриппом и острыми респираторными заболеваниями и готовности к предстоящей пандемии гриппа за счёт усовершенствования способов специфической детекции и мониторинга возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), вакцинации целевых групп населения, создания и апробации платформенных технологий для быстрого выпуска вакцин, расширения мощностей по производству вакцин, а также улучшения сотрудничества между странами в системе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) с разработкой многолетней стратегии борьбы с гриппом¹, в этой сфере остаётся множество проблем и нерешённых вопросов, в частности, в области эпидемиологии и профилактики. Существующая система традиционного надзора за гриппом и ОРВИ располагает только статистической информацией по суммарному числу заболеваний и госпитализаций с этими инфекциями, а также расшифровкой их этиологии в целом среди обследованных групп, однако не даёт информации о клинических особенностях и тяжести заболеваний в зависимости от их этиологии, возраста пациентов и других индивидуальных особенностей. Вместе с тем в последние годы появляются новые данные о роли сопутствующих заболеваний при гриппе, а также отдалённых последствиях тяжёлых острых респираторных инфекций разной этиологии (инфаркты, инсульты, обострения хронической обструктивной болезни лёгких, диабет и др.) [1–3]. Это определяет необходимость дальнейшего совершенствования надзора за гриппом и другими ОРВИ.

Важность персонализированного клинико-эпидемиологического надзора стала очевидной в период развития последней пандемии гриппа, вызванной появлением в 2009 г. нового реассортанта с антигенной формулой A(H1N1)pdm09. С этой целью в России начиная с 2010 г. в рамках пилотного проекта началось исследование возможностей Сигнального (дозорного) надзора за тяжёлыми острыми респираторными заболеваниями (ТОРИ) и гриппоподобными заболеваниями и острыми респираторными инфекциями [4], а с 2012 г. — углублённого Госпитального надзора (ГН) за гриппом и другими ОРВИ в рамках Global Influenza Hospital Surveillance Network [5–9]. Эта система, используемая в научных целях в настоящее время более чем в 20 странах Северного и Южного полушарий, позволяет изучать этиологию тяжёлых форм гриппа, выявлять группы риска, нуждающиеся в первоочередной защите, определять возрастные особенности этиологии ТОРИ с выявлением доминирующих возбудителей, опасных сочетаний с сопутствующими заболеваниями, приводящих к госпитализации, а также оценивать тяжесть эпидемии/пандемии.

В системе ГН на каждого включённого в исследование пациента заполняется обезличенная карта, содержащая код стационара, номер пациента, информацию о поле, возрасте, хронических заболеваниях, статусе вакцинации от гриппа и COVID-19, вредных привычках, предыдущих эпизодах госпитализации, а также критерии тяжести течения инфекции (потребность в кислородной поддержке, гипертермия, перевод в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и др.), исход заболевания и данные лабораторной диагностики. Необходимо отметить, что все участники системы используют унифицированные стандартные определения случая и карты больного, что позволяет сравнивать

¹ World Health Organization. Global influenza strategy 2019–2030. Geneva; 2019. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515320> (дата обращения: 16.04.2024).

особенности ТОРИ по единым критериям в разных странах мира. Главной особенностью является диагностика с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) на вирусы-возбудители респираторных инфекций всех пациентов, включённых в исследование, и проведение секвенирования и антигенного анализа для ряда образцов от пациентов. Анализ антигенной и генетической структуры вирусов гриппа позволяет определить, соответствуют ли вирусы, циркулирующие в конкретном сезоне, штаммам, введённым в состав вакцины.

Распространение пандемии COVID-19 привело к выраженному смещению в структуре циркулирующих вирусов гриппа и ОРВИ среди госпитализированных различных возрастных групп пациентов с ТОРИ. В этой связи **целью** исследования было проведение мониторинга этиологии ТОРИ у госпитализированных детей и взрослых с оценкой влияния на этот процесс пандемии COVID-19.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Клинико-лабораторный мониторинг гриппа, COVID-19 и других ОРВИ среди госпитализированных больных в рамках ГН проводился в 9 больницах Санкт-Петербурга, Новосибирска и Екатеринбурга в соответствии с используемыми в ГН Стандартными протоколами обследования для детей младше 5 лет и для пациентов в возрасте 5 лет и старше. В дополнение к основным параметрам (пол, возраст, сроки госпитализации, этиология по данным ПЦР, вакцинация в анамнезе, диагноз при поступлении и выписке, сопутствующая патология, курение, исход заболевания и др.) врачи оценивали тяжесть заболевания. Исследование проводили в соответствии с принципами Надлежащей клинической практики после его одобрения Локальными этическими комитетами. На протяжении всех 5 сезонов (с 2018–2019 по 2022–2023 гг.) скрининговое обследование начиналось с 40-й недели, а основные исследования в системе ГН начинали на неделе, когда с помощью ПЦР в больницах города были выявлены первые 3 лабораторно подтвержденных случая гриппа. Исследования завершались по окончании эпидемического по гриппу сезона, как правило, на 18–20-й неделе, когда в палатах всех больниц, включённых в исследование, больше не было выявлено ни одного случая ТОРИ с лабораторно подтверждённым гриппом. Продолжительность исследования в среднем составляла 6–7 мес. Результаты обследования больных вводились врачами в Индивидуальные карты больных и направлялись через интернет в Электронную базу данных при НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, где они (после контроля полноты и точности заполнения) хранились на протяжении всего периода выполне-

ния работ с возможностью автоматизированного вывода запрашиваемых данных.

Для включения в исследование у пациентов должна была быть комбинация следующих симптомов: 1 и более из 4 системных симптомов (повышенная температура, слабость, головная боль, миалгия), а также 1 и более из 3 респираторных симптомов (кашель, боль в горле, учащённое дыхание). Продолжительность заболевания на момент включения в исследование должна была составлять не более 7 дней от начала регистрации симптомов, сроки госпитализации — не более 48 ч. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протоколы исследования одобрены Этическим комитетом НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (протоколы № 194 от 12.12.2022, № 178 от 10.01.2022, № 161 от 14.12.2020, № 149 от 18.12.2019, № 136 от 21.12.2018, № 3120 от 18.12.2017).

Критерии исключения из исследования: иное проживание, продолжительность болезни более 7 сут, продолжительность госпитализации менее 24 ч, принадлежность пациента к специализированному медицинскому или социальному учреждению, отсутствие согласия больного на участие в исследовании, невозможность коммуникации с больным.

Сбор и статистический анализ данных

Сбор данных, их последующая коррекция, систематизация исходной информации и анализ полученных результатов осуществлялись специалистами НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева с использованием введённых врачами Индивидуальных карт больных в Электронной базе данных ГН.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Statistica v. 10»: описательная статистика, непараметрические критерии. При оценке количественных показателей в качестве центра распределения была посчитана медиана, в качестве показателей вариации — первый (Q_1) и третий (Q_3) квартили. Результаты качественных признаков выражали в абсолютных числах с указанием долей (%). Сравнение номинальных данных в группах проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона. В тех случаях, когда число ожидаемых наблюдений в любой из ячеек четырёхпольной таблицы было менее 10, для оценки уровня значимости различий использовали точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

ПЦР-диагностика

Для лабораторной диагностики от каждого пациента в возрасте 14 лет и старше брали назофарингеальные и орофарингеальные мазки, для детей младше 14 лет — мазки из носа и глотки. Лабораторное тестирование на вирусы гриппа и другие возбудители ОРВИ проводили в ПЦР в течение

первых 48 ч госпитализации. Для взятия клинических образцов использовали вельюровые тампоны («Сорап»), которые погружали в универсальную транспортную среду «UTM-330С» («Сорап») для микоплазм, хламидий и вирусов. РНК выделяли из клинических образцов с использованием наборов «AmpliSense RIBO-prep» («ИнтерЛабСервис») или «QIAGEN RNeasy Mini» («Qiagen»). Обратную транскрипцию РНК проводили набором «Реверта-Л» («ИнтерЛабСервис») или «QIAGEN OneStep RT-PCR» («Qiagen»). Для тестирования на грипп А и В в исследовании использовали наборы «АмплиСенс Вирус гриппа А/В-FL» («ИнтерЛабСервис»); положительные на грипп А образцы использовали для субтипирования вирусов гриппа А(H1N1) pdm09 и А(H3N2) с использованием наборов «АмплиСенс Influenza virus А/Н1-swine-FL» («ИнтерЛабСервис») и «AmpliSense Influenza A subtyping-FL» («ИнтерЛабСервис»). Все образцы также были проверены на наличие других возбудителей ОРВИ (респираторно-синцитиальный вирус человека (РСВ), метапневмовирус, вирус парагриппа 1–4-го типов, коронавирус, риновирус, аденовирусы,

бокавирус) и исследованы с помощью набора «AmpliSense ARVI-screen-FL» («ИнтерЛабСервис»). Специфические последовательности вируса гриппа В линий Yamagata или Victoria определяли во всех положительных на грипп В образцах с использованием набора «QIAGEN OneStep RT-PCR Kit» («Qiagen») с рекомендуемыми ВОЗ праймерами и зондами. ПЦР в реальном времени проводили на «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research») или системе обнаружения ПЦР в реальном времени «CFX96 Touch» («Bio-Rad»).

Результаты

Возрастная структура пациентов

За 5-летний период, начиная с сезона 2018–2019 гг., в 3 инфекционных стационарах для взрослых и 6 многопрофильных больницах для детей Санкт-Петербурга, Новосибирска и Екатеринбурга было обследовано 18 458 больных, госпитализированных в отделения для больных с ОРВИ с первичными диагнозами гриппа, ОРВИ, пневмонии, острого бронхита и другими проявлениями острых респираторных инфекций разной степени тяжести. Анализ возрастной структуры госпитализированных (в среднем) показал значительный удельный вес среди них детей (73,8%), в том числе в возрасте ≤ 2 лет (39,7%), 3–6 лет (18,5%), 7–14 лет (15,6%). Частота госпитализации пациентов в возрасте 15–64 года в среднем за весь период составила 19,7%, больных в возрасте 65 лет и старше — 6,5% (табл. 1).

Частота госпитализации детей возрастной группы 0–2 года в целом за изучаемый период была достоверно выше ($p < 0,001$), чем больных всех других возрастных групп (рис. 1), а также достоверно выше в 2018–2019 и 2020–2023 гг. В период с октября 2019 г. по сентябрь 2020 г., когда в России развилась первая волна пандемии, возрастная структура госпитализированных в отделения с ОРВИ больных изменилась: частота госпитализации в группе

Таблица 1. Возрастное распределение госпитализированных больных, включённых в исследование

Table 1. Age distribution of the admitted patients included in the study

Возраст, лет Age, years	Число больных Number of patients	Медиана возраста, лет (Q ₁ ; Q ₃) Median age, years (Q ₁ ; Q ₃)
0–2	7321	11* (5; 23)
3–6	3418	4,25 (3,5; 5,33)
7–17	2880	10,33 (8,42; 12,5)
18–64	3645	31,66 (21,5; 45,8)
≥ 65	1194	75,75 (70,0; 83,7)
Всего Total	18458	4,75 (1,5; 21,7)

Примечание. *Для детей из группы 0–2 года возраст указан в месяцах.

Note. *For children of group 0–2 years, age indicated in months.

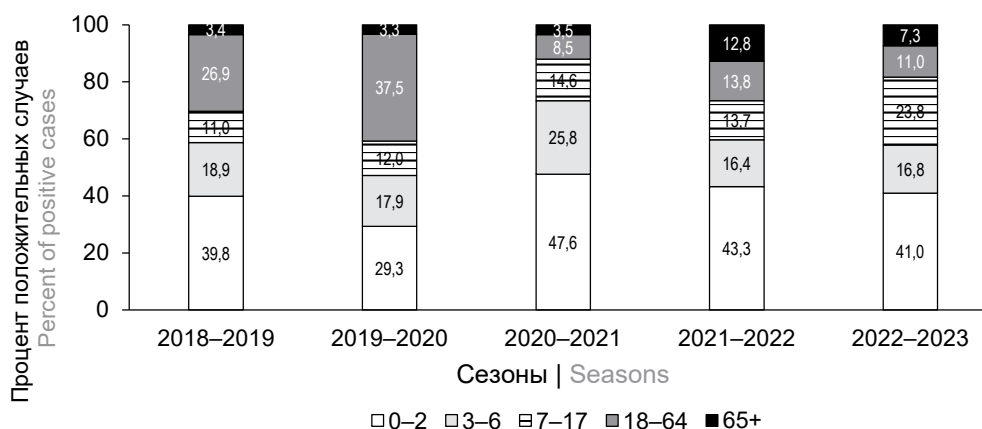


Рис. 1. Возрастное распределение включённых в исследование больных гриппом, COVID-19 и другими ОРВИ.

Fig. 1. Age distribution of patients with influenza, COVID-19 and other acute respiratory infections included in the study.

15–64 года увеличилась до 37% на фоне снижения госпитализации детей в возрасте до 2 лет до 29,3% ($p < 0,001$). В 2021–2022 гг. отмечен рост частоты госпитализации пациентов в возрасте 65 лет и старше в сравнении с частотой госпитализации в другие годы ($p < 0,000$).

Этиология острых респираторных инфекций

Вирусная этиология заболеваний в среднем за весь период была расшифрована в 58,3% случаев (57,8–59,1%; $p = 0,95$). В наших наблюдениях частота суммарного выявления негриппозных ОРВИ за весь период и в последние 3 сезона была достоверно выше ($p < 0,0001$), чем случаев лабораторно подтверждённого гриппа и SARS-CoV-2. Интересно, что соотношение больных, госпитализированных с лабораторно подтверждённым гриппом и другими ОРВИ, было сходным до пандемии в 2018–2019 и 2019–2020 гг. (0,95 и 1,2 соответственно; $p = 0,275$), однако резко изменилось в последующие 3 года в связи с распространением SARS-CoV-2. Так, в

2020–2021 гг. вирус гриппа был практически вытеснен из циркуляции и в системе ГН выявлялся только в 0,1% случаев, хотя другие возбудители ОРВИ (за исключением РСВ) определялись с такой же или даже большей частотой (89,0%).

В постпандемический период частота детекции вирусов гриппа среди госпитализированных стала повышаться (до 11,7–22,3%), однако так и не достигла предпандемического уровня и оставалась достоверно ниже ($p < 0,001$) в сравнении с ОРВИ (в 4,3 и 2,9 раза в сезоны 2021–2022 и 2022–2023 гг.). Частота детекции SARS-CoV-2 достигла максимума (38,4%) в сезон 2021–2022 гг. со снижением до 11,4% в последнем сезоне (рис. 2).

Анализ заболеваний, вызванных разными типами/подтипами вируса гриппа

В сезоны 2018–2019 и 2019–2020 гг. основным этиологическим агентом был вирус гриппа А(H1N1) pdm09, который вызвал 53,2 и 44,0% гриппозных заболеваний соответственно и социркулировал с

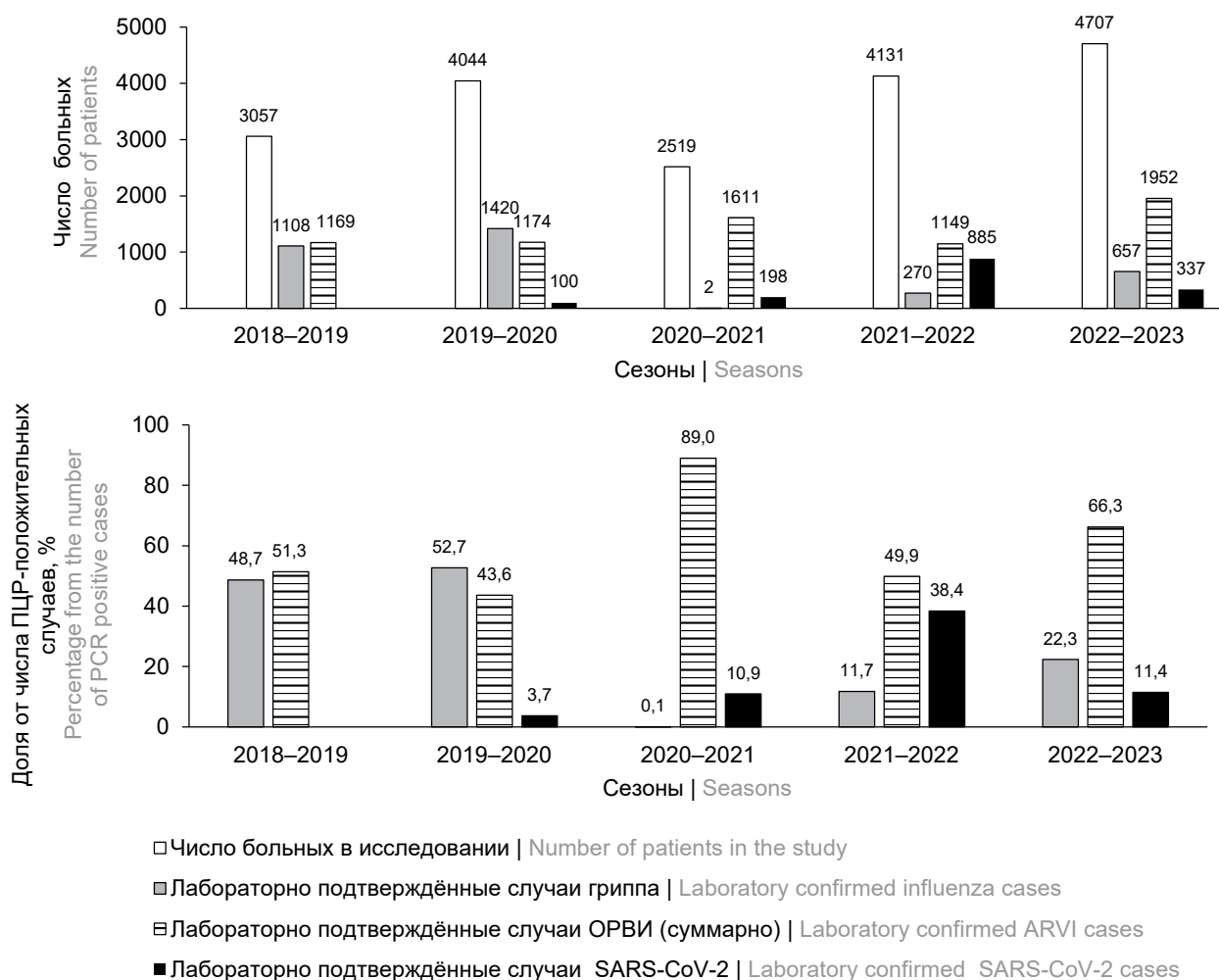


Рис. 2. Изменения в частоте лабораторно подтверждённых случаев гриппа, ОРВИ (суммарно) и COVID-19 среди госпитализированных больных за 5-летний период.

Fig. 2. Changes in the frequency of laboratory-confirmed cases of influenza, ARVI (total) and COVID-19 among hospitalized patients over a 5-year period.

вирусом гриппа А(Н3N2) (45,1%) в 2018–2019 гг. и с вирусом гриппа В Victoria (48,6%) в 2019–2020 гг. Немногочисленные случаи гриппа В линии Yamagata были зафиксированы в конце сезона 2018–2019 гг. (9 случаев) и 2019–2020 гг. (2 случая), в остальных случаях гриппа В выявлялись только вирусы линии Victoria. В сезон 2020–2021 гг., с началом активной фазы пандемии COVID-19 в России, среди госпитализированных больных случаев гриппа зарегистрировано не было, за исключением 2 случаев в Екатеринбурге, когда у больных были выявлены следовые количества РНК вируса гриппа В, не позволявшие провести его субтипирование.

Сезон 2021–2022 гг. характеризовался необычно ранним началом циркуляции вируса гриппа А(Н3N2): первые случаи гриппа среди госпитализированных больных были выявлены уже на 41-й неделе 2021 г., а на 48-й неделе число случаев гриппа достигло пиковых значений. Эпидемия носила моноэтиологический характер (97,0%) и была вызвана вирусом гриппа А(Н3N2). Лишь в конце сезона были выявлены единичные случаи гриппа В. На фоне возросшего количества случаев госпитализации с COVID-19 общее число случаев гриппа среди госпитализированных больных стало достоверно меньшим ($p < 0,001$) в 4,0 и 5,5 раза по сравнению с сезонами 2018–2019 и 2019–2020 гг. соответственно. Последний эпидемический по гриппу сезон отличался кардинальной сменой возбудителя с возвратом подтипа вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 и вирусов гриппа В линии Victoria (табл. 2, рис. 3).

Таким образом, особенностью последних 2 эпидемий было более раннее начало циркуляции вирусов гриппа (на 6–9 нед по сравнению с эпидемиями предпандемического периода) с достижением пика ПЦР-детекции вирусов у госпитализированных пациентов уже на 48-й и 50-й неделях года

(по сравнению с 5–7-й неделей последующего года в предпандемические сезоны) (рис. 3).

Мониторинг этиологии негриппозных острых респираторных заболеваний

Изучение структуры респираторной заболеваемости негриппозной этиологии, заболеваемость которой по численности среди госпитализированных больных достоверно превосходила заболеваемость гриппом (38,2% против 21,7% от числа обследованных пациентов; $p < 0,0001$), показал, что в предпандемический период наиболее значимым ($p < 0,0001$) возбудителем был РСВ, который вызывал наибольшее число госпитализаций (до 26,8% у детей в возрасте до 2 лет). Следующим по значимости оказались риновирусы (до 16,6% в этой возрастной группе). Роль остальных возбудителей в целом была относительно невелика.

Возникшая пандемия COVID-19 в корне изменила этиологическую картину: в сезон 2020–2021 гг. РСВ (как и вирусы гриппа) практически исчез из циркуляции, и лишь единичные случаи этой инфекции регистрировались среди госпитализированных больных. Особый интерес представляет резко возросшая (в 6–12 раз) значимость метапневмовирусной инфекции ($p < 0,000$), возбудитель которой принадлежит к тому же семейству, что и РСВ (*Pneumoviridae*). В следующем сезоне (2021–2022 гг.) случаев метапневмовирусной инфекции практически не регистрировали, но в циркуляции вновь появился РСВ, который в сезоне 2022–2023 гг. ещё более активизировался, достигнув показателей, свойственных предпандемическому периоду (рис. 4).

Возрастные особенности этиологии наиболее значимых респираторных инфекций

Анализ суммарных ежегодных данных по роли основных возбудителей в госпитализации больных в зависимости от возраста показал, что все эти го-

Таблица 2. Роль вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В в развитии респираторных заболеваний, требующих госпитализации, за 5 последовательных сезонов

Table 2. The role of influenza viruses A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B in the development of acute respiratory diseases requiring hospitalization over 5 consecutive seasons

Сезон Season	Число больных Number of patients	Из них с гриппом Influenza cases		Процент от числа ПЦР-положительных случаев гриппа по типам/субтипам Percentage of PCR-positive influenza cases by type/subtype			
		число number	%	А(Н1N1) pdm09	А(Н3N2)	А несубтипированный A not subtyped	В
2018–2019	3057	1108	36,2	53,2	45,1	0,4	1,3
2019–2020	4044	1420	35,1	44,0	5,4	2,0	48,6
2020–2021	2519	2	0,1	0,0	0,0	0,0	–
2021–2022	4131	270	6,5	0,0	97,0	0,4	2,6
2022–2023	4707	657	14,0	42,8	0,3	18,7	38,2
Всего Total	18458	3457	18,7	43,3	24,3	4,5	27,9

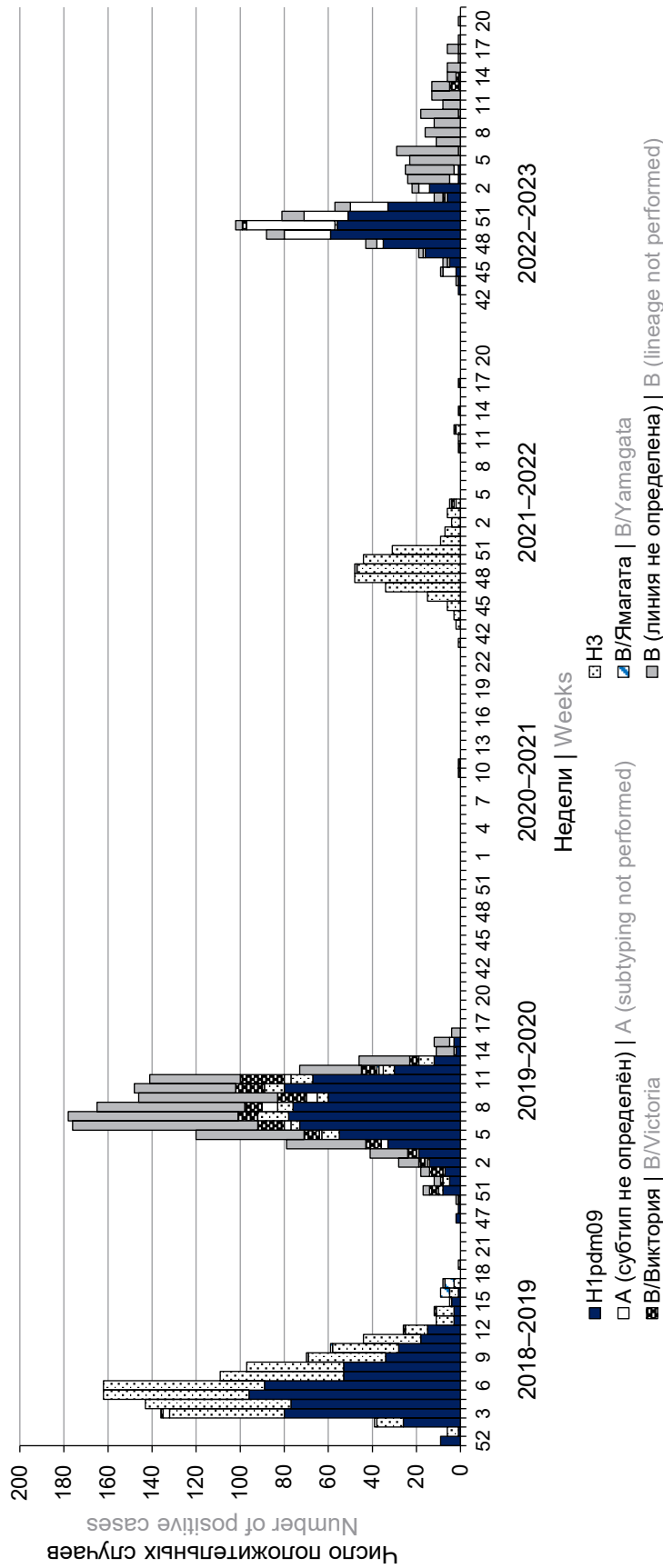


Рис. 3. Мониторинг ПЦР-детекции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и B среди госпитализированных больных за 5 последовательных сезонов в системе ГН.

Fig. 3. Monitoring of PCR-detection of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B viruses among hospitalized patients for 5 consecutive seasons in the hospital surveillance system.

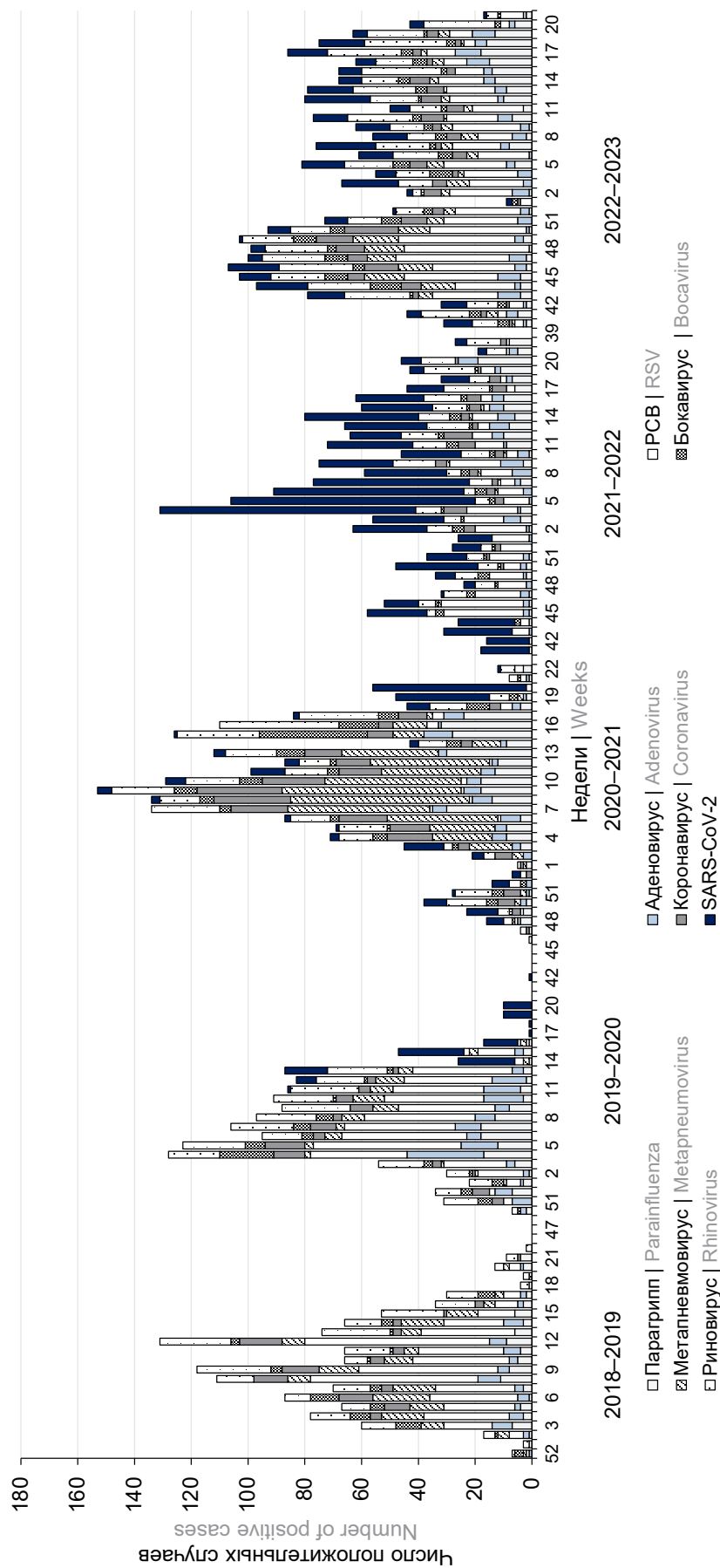


Рис. 4. Изменение этиологической мозаики распределения возбудителей ОРВИ в развитии тяжёлых форм заболеваний, требующих госпитализации, в связи с развитием пандемии COVID-19.

Fig. 4. Changes in the etiological mosaic of the distribution of ARVI pathogens in the development of severe forms of diseases requiring hospitalization due to the development of the COVID-19 pandemic.

ды, за исключением двух сезонов активного распространения SARS-CoV-2, РСВ поражал преимущественно детей младших возрастных групп 0–2 и 3–6 лет (до 16,5–26,8% больных), но редко регистрировался в возрастных группах 7 лет и старше ($p < 0,0001$). Возрастной диапазон для риновирусной инфекции был значительно шире и охватывал все детские возрастные группы. Частота выявления риновирусов у госпитализированных детей возрастной группы 0–2 года варьировала от 10,1 до 16,6% и была достоверно выше, чем у взрослых больных в возрасте 18–64 и 65 лет и старше во все годы ($p < 0,001$). Отличия между частотой детекции риновирусов у госпитализированных детей в возрасте 0–2 и 3–6 лет были недостоверны. Интересно, что в сезон 2020–2021 гг., когда циркуляция РСВ резко снизилась, был отмечен достоверный рост частоты регистрации риновирусов по сравнению с предыдущими двумя сезонами ($p < 0,001$). В последнем сезоне по сравнению с 2021–2022 гг. наблюдали тенденцию роста частоты регистрации РСВ ($p < 0,001$) и риновирусной инфекции ($p < 0,001$) на фоне снижения значимости COVID-19 ($p < 0,001$).

В отличие от РСВ и риновирусной инфекции, у детей COVID-19 как причина госпитализации регистрировался значительно реже, чем у взрослых ($p < 0,001$). В начале пандемии (сезон 2019–2020 гг.) случаев COVID-19 среди госпитализированных детей в возрасте до 17 лет не было зарегистрировано,

в следующем сезоне частота детекции вируса у детей в разных возрастных групп также была невысока и варьировала от 0,8 до 2,4% от числа обследованных в данной возрастной группе (при частоте детекции в 52,1–66,7% у взрослых). В сезон 2021–2022 гг. частота выявления SARS-CoV-2 среди госпитализированных детей возросла до 6,8–13,6%. Эти различия стали менее выраженными в последнем сезоне в связи со снижением выявляемости SARS-CoV-2 как среди детей, так и среди взрослых. Частота детекции SARS-CoV-2 у взрослых больных в возрасте 18–64 и ≥ 65 лет была достоверно выше по сравнению с другими возрастными группами во все сезоны ($p < 0,001$), однако отличия между частотой выявления SARS-CoV-2 в возрастных группах 18–64 и 65 лет и старше были достоверными только в сезон 2022–2023 гг., когда процент госпитализаций взрослых в возрасте 18–64 года снизился в 3,5 раза ($p < 0,001$; табл. 3).

Этиология респираторных заболеваний в отделениях реанимации и интенсивной терапии

За весь период в ОРИТ было направлено 1112 (6,0%) из общего числа 18 458 госпитализированных больных, включённых в исследование. У 668 пациентов были выявлены вирусы гриппа, SARS-CoV-2 или другие возбудители ОРВИ. Чаще всего — в 517 (77,4%) случаях за весь период —

Таблица 3. Возрастные особенности этиологии наиболее значимых респираторных инфекций

Table 3. Age-related peculiarities of the etiology of the most significant respiratory infections

Сезон Season	Возраст, лет Age, years				
	0–2	3–6	7–17	18–64	65+
РСВ RSV					
2018–2019	26,8	16,5	4,8	2,2	4,9
2019–2020	25,7	13,6	3,3	1,0	2,3
2020–2021	1,7	1,2	0,3	0,0	0,0
2021–2022	13,4	6,9	3,6	1,2	1,3
2022–2023	24,1	12,1	3,8	1,3	2,3
Риновирусы Rhinovirus					
2018–2019	10,1	11,3	7,4	4,3	2,9
2019–2020	10,2	8,3	5,1	3,8	1,5
2020–2021	16,6	14,6	14,6	2,3	1,1
2021–2022	13,8	13	6,5	2,6	0,8
2022–2023	14,2	13,7	12,2	5,2	2,9
SARS-CoV-2					
2018–2019	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2019–2020	0,0	0,0	0,0	5,3	15,2
2020–2021	1,2	0,8	2,4	52,1	66,7
2021–2022	10,6	6,8	13,6	50,7	53,6
2022–2023	4,7	1,5	4,0	13,5	34,6

в ОРИТ госпитализировали детей в возрасте до 6 лет, в 86 (12,9%) случаях — детей в возрасте 7–17 лет, частота госпитализации в ОРИТ взрослых была наименьшей — 65 случаев (9,7% от общего числа больных в ОРИТ) (различия достоверны, $p < 0,001$).

У детей младшего возраста (0–6 лет) во все сезоны, кроме 2020–2021 гг., когда широко распространился SARS-CoV-2, чаще всего диагностировали РСВ-инфекцию (28,9–47,7% от всех ПЦР-положительных случаев в ОРИТ). В сезон 2020–2021 гг. частота детекции РСВ упала до 3,6% на фоне возросшей в 2–5 раз роли по сравнению с предыдущими годами метапневмовирусной инфекции (до 28,4%), сезонной коронавирусной инфекции (до 14,2%), бокавирусов (до 11,2%) и риновирусов (до 20,9%) ($p < 0,001$). В следующих 2 сезонах частота регистрации РСВ и риновирусов возросла до 28,9–41,7 и 45,4–18,7% соответственно, притом что COVID-19 диагностировали в этой группе лишь в 0,5–7,2% случаев. Роль вирусов гриппа варьировала в зависимости от сезона: в предпандемический период у детей в возрасте до 6 лет чаще регистрировали вирус гриппа А(H1N1)pdm09 (11,9–16,4% случаев), вирус гриппа А(H3N2) выявляли в 0,9–7,3%, вирус гриппа В — до 9,2% случаев. В сезон 2020–2021 гг. заболеваний гриппозной этиологии среди детей в ОРИТ не регистрировали, и частота их детекции в постпандемический период в ОРИТ не превышала 4,1%.

У детей школьного возраста 7–17 лет основными причинами госпитализации в ОРИТ были вирусы гриппа А(H1N1)pdm09 — 66,7 и 25,0% в сезоны 2018–2019 и 2022–2023 гг., вирусы гриппа А(H3N2) — 12,5 и 30,0% в сезоны 2019–2020 и

2021–2022 гг. и вирусы гриппа В — 50,0 и 19,4% в сезоны 2018–2019 и 2019–2020 гг., а в сезон 2020–2021 гг. чаще всего выявляли метапневмовирус (24,0%), сезонный коронавирус (14,0%) и риновирусы (30,2%). Случаи COVID-19 чаще всего (32,0%) регистрировали у школьников в сезон 2021–2022 гг. со снижением до 8,4% в следующем сезоне на фоне возросшей роли вирусов гриппа и РСВ.

Иную картину наблюдали у взрослых пациентов. Если в предпандемический период основной причиной госпитализации в ОРИТ были вирусы гриппа В, то, начиная с сезона 2019–2020 гг., основной причиной госпитализации в ОРИТ стал вирус SARS-CoV-2 (60–100% случаев). Роль остальных возбудителей в развитии ТОРИ у взрослых была невелика.

Сравнительный анализ этиологии заболеваний у пациентов, госпитализированных в общие отделения для ОРВИ (ОБ) и в ОРИТ, показало, что у детей младшего возраста частота диагностирования (ЧД) РСВ в ОРИТ во все сезоны, кроме пандемического 2020–2021 гг., была наиболее высокой и превышала ЧД в ОБ на 8,1–13,2%. В сезон 2021–2022 гг. наблюдали превышение ЧД риновирусной инфекции в ОРИТ по сравнению с ОБ (табл. 4). У детей 7–17 лет в сезоны активной циркуляции вируса гриппа А(H1N1)pdm09 (2018–2019 и 2022–2023 гг.) этот возбудитель диагностировался чаще в ОРИТ по сравнению с ОБ (табл. 5). У взрослых больных основные отличия касались SARS-CoV-2, частота детекции которого в ОРИТ отчётливо превосходила показатели, регистрируемые в ОБ. Различия по другим инфекциям были незначительными (табл. 6).

Таблица 4. Сравнение этиологии ТОРИ у детей 0–6 лет, госпитализированных в общие отделения для ОРВИ и в ОРИТ за 5-летний период наблюдений

Table 4. Comparison of the etiology of SARI in children 0–6 years old hospitalized in general wards for ARVI and in intensive care units (ICU) over a 5-year observation period

Сезон Season	A(H1N1) pdm09	A(H3N2)	В	Пара- грипп Para- influenza	Адено- вирус Adeno- virus	РСВ RSV	Метапневмо- вирус Metapneumo- virus	Корона- вирус Corona- virus	Бока- вирус Boca- virus	Рино- вирус Rhino- virus	SARS-CoV-2
Все пациенты All patients											
2018–2019	23,1	13,5	0,4	3,9	3,3	27,1	8,9	4,1	3,6	12,1	0,0
2019–2020	22,7	2,0	15,2	5,5	5,7	26,2	3,7	3,3	3,8	11,8	0,0
2020–2021	0,0	0,0	0,1	16,9	5,3	2,0	29,8	14,8	9,0	20,7	1,3
2021–2022	0,0	11,4	0,3	12,3	6,9	20,1	0,4	4,6	3,7	23,5	16,6
2022–2023	9,1	0,1	6,3	7,2	4,4	28,5	6,1	7,1	6,6	19,5	5,2
Пациенты ОРИТ ICU patients											
2018–2019	16,4	7,3	1,8	9,1	3,6	38,2	5,5	3,6	7,3	7,3	0,0
2019–2020	11,9	0,9	9,2	2,8	0,9	47,7	5,5	3,7	4,6	12,8	0,0
2020–2021	0,0	0,0	0,0	11,2	6,0	3,0	28,4	14,2	11,2	20,9	5,2
2021–2022	0,0	4,1	0,0	3,1	3,1	28,9	0,0	5,2	3,1	45,4	7,2
2022–2023	2,7	0,0	3,2	9,1	3,7	41,7	7,0	5,9	7,5	18,7	0,5

Таблица 5. Сравнение этиологии ТОРИ у детей 7–17 лет, госпитализированных в общие отделения для ОРВИ и в ОПИТ за 5-летний период наблюдений**Table 5.** Comparison of the etiology of SARI in children 7–7 years old hospitalized in general wards for ARVI and in intensive care units (ICU) over a 5-year observation period

Сезон Season	A(H1N1) pdm09	A(H3N2)	B	Пара- грипп Para- influenza	Адено- вирус Adeno- virus	PCB RSV	Метапневмо- вирус Metapneumo- virus	Корона- вирус Corona- virus	Бока- вирус Boca- virus	Рино- вирус Rhino- virus	SARS-CoV-2
Все пациенты All patients											
2018–2019	35,3	28,4	1,0	2,5	2,0	7,8	4,9	4,4	1,5	12,3	0,0
2019–2020	21,8	5,9	45,7	3,1	5,9	5,5	2,4	0,0	1,0	8,7	0,0
2020–2021	0,0	0,0	0,0	14,5	5,6	0,6	24,0	14,0	6,1	30,2	5,0
2021–2022	0,0	34,9	0,8	5,4	3,3	5,0	0,0	2,9	0,4	15,4	32,0
2022–2023	15,4	0,2	21,2	3,9	5,8	8,1	6,0	5,1	0,4	25,7	8,4
Пациенты ОПИТ ICU patients											
2018–2019	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	11,1	0,0	11,1	0,0
2019–2020	12,5	12,5	50,0	0,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0
2020–2021	0,0	0,0	0,0	5,9	5,9	0,0	23,5	29,4	0,0	35,3	0,0
2021–2022	0,0	30,0	0,0	5,0	0,0	10,0	0,0	10,0	0,0	20,0	25,0
2022–2023	25,0	0,0	19,4	0,0	5,6	13,9	8,3	2,8	2,8	19,4	2,8

Таблица 6. Сравнение этиологии ТОРИ у пациентов старше 18 лет, госпитализированных в общие отделения для ОРВИ и в ОПИТ за 5-летний период наблюдений**Table 6.** Comparison of the etiology of SARI in patients 18+ years hospitalized in general wards for ARVI and in intensive care units (ICU) over a 5-year observation period

Сезон Season	A(H1N1) pdm09	A(H3N2)	B	Пара- грипп Para- influenza	Адено- вирус Adeno- virus	PCB RSV	Метапневмо- вирус Metapneumo- virus	Корона- вирус Corona- virus	Бока- вирус Boca- virus	Рино- вирус Rhino- virus	SARS-CoV-2
Все пациенты All patients											
2018–2019	31,0	45,2	1,2	3,3	1,6	4,5	2,7	3,1	0,0	7,4	0,0
2019–2020	25,3	3,4	38,6	3,3	3,3	2,1	1,3	3,2	0,4	7,0	11,9
2020–2021	0,0	0,0	0,0	4,7	0,5	0,0	5,7	5,2	0,5	2,8	80,6
2021–2022	0,0	2,5	0,2	0,3	0,3	2,2	0,9	1,2	0,3	3,0	89,1
2022–2023	5,9	0,0	4,7	3,7	2,5	4,7	5,0	3,1	0,0	11,5	58,9
Пациенты ОПИТ ICU patients											
2018–2019	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2019–2020	10,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	60,0
2020–2021	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
2021–2022	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	91,7
2022–2023	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	12,5	81,3

Обсуждение

За 5-летний период все 18 458 пациентов, госпитализированных в инфекционные стационары 3 крупных городов России (Санкт-Петербург, Новосибирск, Екатеринбург), были обследованы с помощью ПЦР с целью выяснения роли вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B линии Victoria и Yamagata, SARS-CoV-2, а также иных возбудителей, таких как РСВ, риновирусы, метапневмовирусы, коронавирусы, аденовирусы, вирусы парагриппа, бокавирусы, в развитии ТОРИ, требующих госпита-

лизации, а также для определения возрастных особенностей этиологии заболеваний. Еженедельный мониторинг случаев гриппа среди обследованных больных показал чередование доминантных возбудителей: A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) в сезон 2018–2019 гг., A(H1N1)pdm09 и B в сезон 2019–2020 гг., A(H3N2) в сезон 2021–2022 гг., A(H1N1)pdm09 и B в сезон 2022–2023 гг. Среди вирусов гриппа B во все сезоны преобладали штаммы линии Victoria. Последние случаи гриппа B линии Yamagata в нашем исследовании среди госпитализированных больных

были зафиксированы в конце сезона 2019–2020 гг. В сезон 2020–2021 гг. (развитой пандемии SARS-CoV-2) среди обследованных больных случаев гриппа А и В практически не регистрировали. В сезон 2022–2023 гг. полученные данные по мониторингу этиологии гриппа среди госпитализированных больных отчётливо коррелировали с результатами традиционного надзора в России [10], тогда как в странах Северной Америки и Западной Европы наибольшее распространение получили вирусы гриппа А(Н3N2) [11, 12]. Различия такого рода определяют необходимость формирования собственной стратегии отбора штаммов в состав вакцин в России (с учётом рекомендаций ВОЗ) в целях повышения эффективности вакцинопрофилактики, как это осуществляется на национальном уровне в других высокоразвитых странах, например, National Immunization Advisory Committee Technical Working Group в Китае [13].

Интересные данные были получены при мониторинге расширенной этиологической инфраструктуры респираторных инфекций. Принято считать, что резкий спад активности вирусов гриппа и РСВ в первые годы пандемии, вызванной SARS-CoV-2, был обусловлен широким внедрением противоэпидемических мероприятий [14]. Не отрицая этого, необходимо отметить, что по нашим, более развернутым исследованиям, на фоне подавления этих инфекций в сезон 2020–2021 гг. роль таких возбудителей, как сезонные коронавирусы, вирусы парагриппа и, особенно, метапневмовирусы, в развитии ТОРИ значительно возросла, невзирая на противоэпидемические мероприятия. В последующие сезоны частота детекции РСВ и вирусов гриппа стала восстанавливаться, а значимость метапневмовирусной инфекции в госпитализации больных снизилась до обычно регистрируемых показателей. Эти данные подтверждают ранее высказанное предположение о существовании интерференции между отдельными видами возбудителей на популяционном уровне [15], что ранее наблюдалось только в период развития пандемий гриппа. Так, известно, что подтип сезонного гриппа А(Н1N1) в 2009–2010 гг. оказался полностью вытесненным вновь возникшим реассортантом вирусов гриппа человека, свиней и птиц — вариантом А(Н1N1)pdm09, в 1957–1958 гг. подтип А(Н1N1) был вытеснен вирусом «азиатского» гриппа А(Н2N2), а в сезон 1968–1969 гг. подтип вируса гриппа А(Н2N2) был полностью вытеснен появившимся пандемическим штаммом А(Н3N2) «гонконгского гриппа». Механизмы этого явления нуждаются в дополнительном изучении. Очевидно, что результаты ГН существенно дополняют данные существующего традиционного надзора, позволяя анализировать этиологию ТОРИ, требующих госпитализации, что представляет не только теоретический интерес, но и важность для проведения практически значимых расчетов социально-эконо-

мического ущерба от дорогостоящей госпитализации больных. Известно, что система традиционного надзора позволяет определять старт/окончание эпидемии на основании сравнения фактического уровня заболеваемости с пороговыми значениями (базовыми линиями), рассчитанными по архивным материалам неэпидемической заболеваемости за предыдущие 5 сезонов. Кроме того, эти данные позволяют оценить интенсивность эпидемии, основываясь на среднестатистических данных за предыдущие годы [16–20]. Вместе с тем в последнее время в руководствах ВОЗ ставятся новые задачи: указывается на необходимость определения таких показателей, «как серьёзность и степень тяжести заболевания». Указывается, что «серьёзность заболевания зависит от организма-хозяина, например, от наличия сопутствующих медицинских заболеваний, вызывающих предрасположенность организма человека к развитию тяжёлой формы заболевания, истории профилактических вакцинаций (например, против гриппа и пневмококковой инфекции), возраста человека и доступности медицинской помощи»². ГН открывает новые возможности для определения этих показателей, которые будут отражены в следующих публикациях.

Выводы

Определены особенности этиологии ТОРИ у детей и взрослых с оценкой влияния пандемии COVID-19 на этиологическую инфраструктуру заболеваний.

Еженедельный мониторинг показал изменение этиологической мозаики возбудителей ТОРИ в период пандемии COVID-19 с резким снижением частоты детекции вирусов гриппа и РСВ и её постепенным восстановлением в постпандемический период.

Установлены возрастные особенности этиологии ТОРИ в ОРИТ. Тяжёлые формы заболеваний у детей в ОРИТ в постпандемический период чаще всего были связаны с респираторно-синцитиальной инфекцией, тогда как у взрослых основным возбудителем ТОРИ служил SARS-CoV-2.

Заключение

Данные ГН существенно дополняют эпидемиологическую информацию, получаемую в традиционной системе надзора, что определяет целесообразность его внедрения в клинико-эпидемиологи-

² World Health Organization. WHO global epidemiological surveillance standards for influenza. Geneva; 2014. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506601> (дата обращения: 16.04.2024); ВОЗ. Глобальная программа по гриппу. Оценка степени тяжести пандемического гриппа (ОСТПГ). Руководство ВОЗ по оценке степени тяжести гриппа во время сезонных эпидемий и пандемий. 2017. URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/259392/WHO-WHE-IHM-GIP-2017.2-eng.pdf?sequence=1> (дата обращения: 16.04.2024).

ческую практику. Мониторинг инфекций показал непрерывно меняющуюся этиологическую инфраструктуру ТОРИ с исчезновением гриппа и РСВ в период пандемии COVID-19 и их возвращением в циркуляцию в постпандемический период.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Smeeth L., Thomas S.L., Hall A.J., et al. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(25):2611–8. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041747>
2. Wedzhicha J.A., Seemungal T.A.R. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet.* 2007; 370(9589):786–96. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61382-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61382-8)
3. Andrew M., Pott H., Staadegaard L., et al. Age differences in comorbidities, presenting symptoms and outcomes of influenza illness requiring hospitalization: a worldwide perspective from the Global Influenza Hospital Surveillance Network. *Open Forum Infect. Dis.* 2023; 10(6):ofad244. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad244>
4. Соминина А.А., Смородинцева Е.А., Столяров К.А., Мельникова А.А. Совершенствование системы надзора за гриппом в Российской Федерации: основные результаты сигнального надзора за гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2017; 16(1):7–15. Sominina A.A., Smorodintseva E.A., Stolyarov K.A., Mel'nikova A.A. Enhancement of the influenza surveillance system in the Russian Federation: The main results of the sentinel surveillance for influenza and other acute respiratory viral infections. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2017; 16(1):7–15. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-1-7-15> EDN: <https://elibrary.ru/yjcgz>
5. Puig-Barberà J., Tormos A., Trushakova S., et al. The Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN): a new platform to describe the epidemiology of severe influenza. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2015; 9(6):277–86. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12335>
6. Puig-Barberà J., Mira-Iglesias A., Burtseva E., et al. Influenza epidemiology and influenza vaccine effectiveness during the 2015–2016 season: results from the Global Influenza Hospital Surveillance Network. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1):415. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4017>
7. Baselga-Moreno V., Trushakova S., McNeil S., et al. Influenza epidemiology and influenza vaccine effectiveness during the 2016–2017 season in the Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN). *BMC Public Health.* 2019; 19(1):487. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6713-5>
8. Puig-Barbera J., Burtseva E., Yu H., et al. Influenza epidemiology and influenza vaccine effectiveness during the 2014–2015 season: annual report from the Global Influenza Hospital Surveillance Network. *BMC Public Health.* 2016; 16(Suppl. 1):757. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3378-1>
9. Cohen L., Hansen C., Andrew M., et al. Predictors of severity of influenza-related hospitalizations: results from the Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN). *J. Infect. Dis.* 2024; 229(4):999–1009. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad303>
10. Simon B., Pichon M., Valette M., et al. Whole genome sequencing of A(H3N2) influenza viruses reveals variants associated with severity during the 2016–2017 season. *Viruses.* 2019; 11(2):108. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11020108>
11. Domingo E., Sheldon J., Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76(2):159–216. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>
12. Dinis J.M., Florek K.R., Fatola O.O., et al. Deep sequencing reveals potential antigenic variants at low frequencies in influenza A virus-infected humans. *J. Virol.* 2016; 90(7):3355–65. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03248-15>
13. Sominina A., Danilenko D., Komissarov A.B., et al. Assessing the Intense influenza A(H1N1)pdm09 epidemic and vaccine effectiveness in the post-COVID season in the Russian Federation. *Viruses.* 2023; 15(8):1780. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15081780>
14. Skowronski D.M., Chuang E.S., Sabaiduc S., et al. Vaccine effectiveness estimates from an early-season influenza A(H3N2) epidemic, including unique genetic diversity with reassortment, Canada, 2022/23. *Euro Surveill.* 2023; 28(5):2300043. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.5.2300043>
15. National Immunization Advisory Committee Technical Working Group. Technical guidelines for seasonal influenza vaccination in China (2020–2021). *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2020; 54(10):1035–59. DOI: <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112150-20200911-01198> (in Chinese)
16. Olsen S.J., Azziz-Baumgartner E., Budd A.P., et al. Decreased influenza activity during the COVID-19 pandemic – United States, Australia, Chile, and South Africa, 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2020; 69(37):1305–9. DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6937a6>
17. Adlhoc C., Mook P., Lamb F., et al. Very little influenza in the WHO European Region during the 2020/21 season, weeks 40 2020 to 8 2021. *Euro Surveill.* 2021; 26(11):2100221. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2021.26.11.2100221>
18. Соминина А.А., Даниленко Д.М., Столяров К.А. и др. Интерференция SARS-CoV-2 с другими возбудителями респираторных вирусных инфекций в период пандемии. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2021; 20(4):28–39. Sominina A.A., Danilenko D.M., Stolyarov K.A., et al. Interference of SARS-CoV-2 with other respiratory viral infections agents during pandemic. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2021; 20(4):28–39. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-4-28-39> EDN: <https://elibrary.ru/cdrnsj>
19. Vega T., Lozano J.E., Meerhoff T., et al. Influenza surveillance in Europe: establishing epidemic thresholds by the moving epidemic method. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013; 7(4):546–58. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2012.00422.x>
20. Vega T., Lozano J.E., Meerhoff T., et al. Influenza surveillance in Europe: comparing intensity levels calculated using the moving epidemic method. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2015; 9(5):234–46. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12330>

Информация об авторах

Соминина Анна Адольфовна[✉] — д.м.н., профессор, зав. лаб. изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, anna.sominina@influenza.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9671-0629>

Даниленко Дарья Михайловна — к.б.н., зам. директора по научной работе, зав. отделом этиологии и эпидемиологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6174-0836>

Information about the authors

Anna A. Sominina[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of the risk factors assessment in influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, anna.sominina@influenza.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9671-0629>

Darya M. Danilenko — Cand. Sci. (Biol.), Deputy director for scientific work, Head, Department of etiology and epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6174-0836>

Комиссаров Андрей Борисович — зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>

Писарева Мария Михайловна — к.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1499-9957>

Мусаева Тамара Даировна — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3050-1936>

Столяров Кирилл Александрович — ведущий программист лаб. эпидемиологии гриппа и ОРЗ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1765-2799>

Афанасьева Ольга Ивановна — д.м.н., зав. отделением РВИ у детей НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1229-171X>

Тимонина Вероника Сергеевна — врач Детской городской больницы Святой Ольги, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2887-0126>

Венев Евгений Валерьевич — старший преподаватель НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2769-4586>

Леванюк Татьяна Петровна — ведущий программист лаб. изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-6888-6848>

Смородинова Елизавета Александровна — к.м.н., в.н.с. лаб. изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5002-0523>

Курская Ольга Григорьевна — к.м.н., с.н.с. лаб. вирусологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1931-2026>

Шестопалов Александр Михайлович — д.б.н., профессор, директор НИИ вирусологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1880-8708>

Леленкова Евгения Викторовна — врач-эпидемиолог Федерального научно-исследовательского института вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2004-0977>

Семенов Александр Владимирович — д.б.н., профессор, директор Федерального научно-исследовательского института вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Леонов Дмитрий Анатольевич — д.м.н., профессор, директор НИИ гриппа им. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия; зав. каф. инфекционных болезней и эпидемиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>

Участие авторов: Существенный вклад в концепцию работы, составление проекта работы — *Соминина А.А. (AAS), Даниленко Д.М. (DMD)*; существенный вклад в дизайн работы — *AAS*; сбор данных — *Афанасьева О.И., Тимонина В.С., Венев Е.В., Курская О.Г., Леленкова Е.В.*; формирование электронной базы данных — *Столяров К.А., Писарева М.М.*; постановка ПЦР — *Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Мусаева Т.Д., Курская О.Г.*; формирование Криобанка клинических образцов — *Комиссаров А.Б., Писарева М.М.*; анализ данных — *AAS, DMD, Леванюк Т.П.*; интерпретация данных — *AAS, DMD, Леонов Д.А.*; статистическая обработка результатов — *Столяров К.А., Смородинова Е.А.*; критическая оценка работы на предмет важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение версии для публикации — *Шестопалов А.М., Семенов А.В., Леонов Д.А.* 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.

Andrey B. Komissarov — Head, Laboratory of molecular virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>

Maria M. Pisareva — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1499-9957>

Tamila D. Musaeva — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3050-1936>

Kirill A. Stolyarov — leading programmer, Laboratory of epidemiology of influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1765-2799>

Olga I. Afanasyeva — D. Sci. (Med.), Head, Department of RVI in children, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1229-171X>

Veronika S. Timonina — Doctor, St. Olga Children's City Hospital, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2887-0126>

Evgeny V. Venev — senior lecturer, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2769-4586>

Tatiana P. Levanyuk — leading programmer, Laboratory of risk factors assessment in influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-6888-6848>

Elizaveta A. Smorodintseva — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of risk factors assessment in influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5002-0523>

Olga G. Kurskaya — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of virology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1931-2026>

Alexander M. Shestopalov — D. Sci. (Biol.), Professor, Director, Research Institute of Virology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1880-8708>

Evgenya V. Lelenkova — epidemiologist, Federal Research Institute of Viral Infections "Virome", Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2004-0977>

Alexander V. Semenov — D. Sci. (Biol.), Professor, Director, Federal Research Institute of Viral Infections "Virome", Yekaterinburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Dmitry A. Lioznov — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia; Head, Department of infectious diseases and epidemiology, First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>

Author contribution: Significant contribution to the concept of the work, drafting the work — *Sominina A.A. (AAS), Danilenko D.M. (DMD)*; significant contribution to the design of the work — *AAS*; data collection — *Afanasyeva O.I., Timonina V.S., Venev E.V., Kurskaya O.G., Lelenkova E.V.*; formation of an electronic database — *Stolyarov K.A., Pisareva M.M.*; PCR performance — *Komissarov A.B., Pisareva M.M., Musaeva T.D., Kurskaya O.G.*; formation of a Cryobank of clinical samples — *Komissarov A.B., Pisareva M.M.*; data analysis — *AAS, DMD, Levanyuk T.P.*; interpretation of data — *AAS, DMD, Lioznov D.A.*; statistical processing of results — *Stolyarov K.A., Smorodintseva E.A.*; critical assessment of the work for important intellectual content, final approval of the version for publication — *Shestopalov A.M., Semenov A.V., Lioznov D.A.* 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 19.04.2024;
accepted for publication 05.06.2024;
published 29.06.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-510>



Молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России

Вязовая А.А.¹, Соловьева Н.С.², Герасимова А.А.¹, Журавлев В.Ю.², Мокроусов И.В.¹

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Фторхинолоны остаются ключевыми противотуберкулёзными препаратами 2-го ряда.

Цель исследования — молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России.

Материалы и методы. Ретроспективная коллекция исследования включала изоляты *M. tuberculosis*, выделенные в 2015–2019 гг. от ранее не леченных больных туберкулёзом, проживающих в различных областях северо-запада России. Чувствительность к противотуберкулёзным препаратам (в том числе к фторхинолону офлоксацину) определяли с применением ВАСТЕС MGIT960 или метода абсолютных концентраций. Мутации в гене *gyrA* как маркере устойчивости к фторхинолонам выявляли методом ПЦР в реальном времени. Принадлежность к генотипу Beijing и его субтипам устанавливали методами ПЦР и ПЦР в реальном времени. Штаммы других генотипов (не-Beijing) сполитоготипировали.

Результаты и обсуждение. Фенотипическая устойчивость к офлоксацину установлена у 6,7% (40/599) штаммов и у 17,4% (40/230) штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. К генотипу Beijing принадлежали 34 (85%) из 40 устойчивых к офлоксацину штаммов, 18 (45%) штаммов были отнесены к российскому эпидемическому субтипу Beijing B0/W148-кластер и 12 (30%) — к Beijing Central Asian/Russian. Остальные 6 офлоксацин-устойчивых штаммов принадлежали к евро-американской филогенетической линии. Мутации в *gyrA* обнаружены у 97,5% (39/40) штаммов, наиболее часто — в кодоне 94 (69,2%; 27/39). Замена Asp94Gly была выявлена в 57,5% (23/40) офлоксацин-устойчивых штаммов и доминировала среди штаммов как Beijing (19/34), так и не-Beijing (4/6). Второй по частоте была замена Ala90Val (25%; 10/40). Более половины офлоксацин-устойчивых штаммов Beijing B0/W148 (10/18) и Central Asian/Russian (7/12) несли мутацию Asp94Gly.

Заключение. На северо-западе России в 2016–2019 гг. первичная резистентность *M. tuberculosis* к фторхинолонам составляла 6,7% в общей популяции возбудителя туберкулёза и 17,4% у штаммов с множественной лекарственной устойчивостью и была обусловлена преимущественно мутациями *gyrA* Asp94Gly и Ala90Val. Наибольшая доля фторхинолон-резистентных штаммов *M. tuberculosis* была у генотипа Beijing B0/W148.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, лекарственная устойчивость, фторхинолоны, офлоксацин, генотип Beijing, Central-Asian/Russian, B0/W148

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 61 от 02.04.2020).

Благодарность. Мы благодарим коллег из региональных туберкулёзных диспансеров за предоставленные штаммы и Р.С. Мударисову за техническую помощь.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 24-44-00004).

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

Для цитирования: Вязовая А.А., Соловьева Н.С., Герасимова А.А., Журавлев В.Ю., Мокроусов И.В. Молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):342–350.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-510>

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

Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of Russia

Anna A. Vyazovaya¹✉, Natalia S. Solovieva², Alena A. Gerasimova¹,
Viacheslav Yu. Zhuravlev², Igor V. Mokrousov¹✉

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

²St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Fluoroquinolones remain the key second-line anti-tuberculosis drugs.

The aim of the study was the molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of the Russian Federation.

Materials and methods. The retrospective study collection included *M. tuberculosis* isolates isolated in 2015–2019 from previously untreated tuberculosis patients. Susceptibility to antituberculosis drugs (including the fluoroquinolone ofloxacin) was determined using the BACTEC MGIT960 or absolute concentration method. Mutations in the *gyrA* gene as a marker of resistance to fluoroquinolones, were detected by real-time PCR. Beijing genotype and its subtypes were detected by PCR and real-time PCR methods. Non-Beijing strains were spoligotyped.

Results and discussion. Phenotypic resistance to ofloxacin was detected in 6.7% (40/599) of strains and in 17.4% (40/230) of MDR strains. 34 of 40 (85%) ofloxacin-resistant strains belonged to the Beijing genotype. 18 (45%) strains were assigned to the Russian epidemic subtype Beijing B0/W148 and 12 (30%) to Beijing Central Asian/Russian. The remaining 6 ofloxacin-resistant strains belonged to the Euro-American phylogenetic lineage. Mutations in the *gyrA* gene were found in 97.5% (39/40) of strains. The most common were mutations in codon 94 (69.2%, 27/39). The *Asp94Gly* substitution was identified in 57.5% (23/40) of ofloxacin-resistant strains and was dominant among Beijing (19/34) and non-Beijing (4/6) strains. The second most common substitution was *Ala90Val* (25%, 10/40). More than half of the ofloxacin-resistant strains, Beijing B0/W148 (10/18) and Central Asian/Russian (7/12), carried the *Asp94Gly* mutation.

Conclusion. In the Northwest of Russia in 2016–2019, primary resistance of *M. tuberculosis* to fluoroquinolones was 6.7% in the total collection and 17.4% of MDR strains, and was mainly caused by the *gyrA Asp94Gly* and *Ala90Val* mutations. Beijing B0/W148 genotype was characterized by the largest proportion of fluoroquinolone-resistant strains.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, drug resistance, fluoroquinolones, ofloxacin, Beijing genotype, Central-Asian/Russian, B0/W148

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the St. Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 61, 4 April, 2020).

Acknowledgement. We express our gratitude to colleagues from regional TB dispensaries for providing the strains and R.S. Mudarisova for technical assistance.

Funding source. The study was financially supported by Russian Science Foundation (grant 24-44-00004).

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

For citation: Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Gerasimova A.A., Zhuravlev V.Yu., Mokrousov I.V. Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of Russia *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):342–350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-510> EDN: <https://www.elibrary.ru/lrtgfs>

Введение

Снижение заболеваемости туберкулёзом (ТБ) в России (с 57,7 на 100 тыс. населения в 2015 г. до 31,1 в 2022 г.) сопровождается сохранением распространения лекарственно устойчивых, прежде всего мультирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Доля множественной лекарственной

устойчивости (МЛУ) среди впервые выявленных больных (первичная МЛУ) выросла с 27,5% в 2016 г. до 34% в 2022 г.¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний. URL: https://nmrc.ru/for_specialists/main-directions/tuberculosis

Согласно классическому многолетнему определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), МЛУ обладают штаммы, одновременно устойчивые к двум ключевым антибиотикам 1-го ряда: изониазиду и рифампицину. Лечение МЛУ-ТБ требует применения препаратов 2-го ряда, к которым микобактерии также приобретают устойчивость. В дополнение к МЛУ-ТБ в 2006 г. ВОЗ ввела определение широкой (дополнительная устойчивость к фторхинолонам и инъекционным антибиотикам; ШЛУ) и предширокой (дополнительная устойчивость к или фторхинолонам или инъекционным антибиотикам; пре-ШЛУ) лекарственной устойчивости [1]. Снижение роли инъекционных антибиотиков и более широкое применение новых препаратов привело к модификации определения ШЛУ и пре-ШЛУ ТБ, которое рекомендовано ВОЗ к использованию в клинических целях и для эпидемиологического надзора с января 2021 г. Согласно новой классификации, ТБ, вызываемый МЛУ-штаммами *M. tuberculosis*, устойчивыми к любому из фторхинолонов, обозначили как пре-ШЛУ-ТБ². Штаммы с пре-ШЛУ, имеющие дополнительную устойчивость к бедаквилину или линезолиду, определены как ШЛУ.

Таким образом, фторхинолоны (ранее — офлоксацин, в настоящее время — левофлоксацин и фторхинолон нового поколения моксифлоксацин) сохранили своё значение при лечении МЛУ-ТБ. Развитие устойчивости к ним имеет значение для исхода лечения: исследование в Архангельске в 2005–2008 гг. показало, что неблагоприятные исходы были более вероятны среди пациентов с приобретённой устойчивостью к капреомицину (100% против 25,9%), офлоксацину (83,6% против 22,7%) или ШЛУ (100% против 24,4%) [2].

Мишенью фторхинолонов служит фермент ДНК-гираза, который необходим для осуществления репликации и транскрипции в клетке *M. tuberculosis* [3]. Устойчивость к фторхинолонам в 90% случаев связана с мутациями в генах *gyrA* и *gyrB*, кодирующих ДНК-гиразу. Мутации в горячем участке гена *gyrA* (область, определяющая устойчивость к хинолонам, кодоны 88–94) представляют основной механизм устойчивости, в то время как мутации в гене *gyrB* встречаются гораздо реже и роль некоторых из них в устойчивости к фторхинолонам не всегда очевидна [4, 5]. Наиболее распространёнными мутациями в *gyrA* являются Ala90Val, Asp94 (Gly, Ala, His, Asn или Tyr) и Ser91Pro, реже встречается мутация Gly88Cys [6–12].

Офлоксацин в настоящее время не применяется для противотуберкулёзной терапии, и существен-

ная доля штаммов, фенотипически устойчивых к офлоксацину, чувствительны к моксифлоксацину. Вместе с тем стремительное развитие лекарственной устойчивости к офлоксацину и, как следствие, значительное снижение терапевтической эффективности привело к директивному отказу от использования данного препарата в лечении ТБ. В последние годы в рекомендации ВОЗ, а также в российские методические рекомендации [13] были внесены существенные изменения в части тестирования лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* бактериологическими методами — из перечня препаратов, тестирование к которым рекомендовано, были исключены офлоксацин, циклосерин, парааминосалициловая кислота.

В то же время молекулярный механизм устойчивости ко всем фторхинолонам опосредован мутациями в генах ДНК-гиразы, и в новом каталоге ВОЗ мутаций устойчивости к противотуберкулёзным препаратам приведён перечень доказанных мутаций устойчивости в *gyrA* применительно именно к фторхинолону нового поколения — моксифлоксацину [14]. При этом ряд мутаций определён как приводящие к высокому уровню устойчивости к моксифлоксацину: *gyrA* Gly88Cys, Asp94Asn, Asp94Gly, Asp94His, Asp94Tyr.

На северо-западе России первое исследование штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к офлоксацину, направленное на изучение вариативности генов *gyrA* и *gyrB*, было проведено в 2008 г. и преимущественно на штаммах, выделенных от ранее леченных больных ТБ (85,4%) [15]. Анализ такой выборки не позволяет дать надёжный ответ на вопрос о том, какие штаммы активно циркулируют в настоящее время, — такой анализ требует когорты впервые выявленных больных.

M. tuberculosis характеризуется клональной структурой популяции, состоящей из крупных филогенетических линий, меньших генотипов и генетически компактных кластеров близкородственных штаммов. Часть генотипов или их субтипов отличаются ассоциацией с лекарственной устойчивостью, повышенная трансмиссивность или гипервирулентность что определяет их клиническую значимость и необходимость более тщательного мониторинга распространения. Для России характерно доминирование генотипа Beijing в популяции в целом, особенно сильное среди устойчивых штаммов. Ранее исследование штаммов, устойчивых к офлоксацину, на северо-западе России показало, что 73% штаммов от ранее леченных пациентов и 71% штаммов от впервые выявленных больных принадлежали генотипу Beijing [16]. Мутация в гене *gyrA* была обнаружена у 89% штаммов Beijing и 69% штаммов других генотипов. Такое доминирование штаммов Beijing среди устойчивых к офлоксацину существенно выше доли генотипа Beijing на северо-западе

² World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Geneva; 2021.
URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018662>

России: 52–56% [16, 17] в общей популяции; 34% среди чувствительных штаммов в Санкт-Петербурге [17]. Авторы исследования 2008 г. сделали вывод о том, что, аналогично распространению МЛУ-ТБ, распространение ТБ с устойчивостью к фторхинолонам в России может быть обусловлено преобладанием генотипа Beijing в популяции *M. tuberculosis* [15].

В другом исследовании на северо-западе России [18] генотип Beijing был выявлен у 70,8% изолятов с низким уровнем резистентности к офлоксацину, 84,6% изолятов с высоким уровнем резистентности и 50% чувствительных штаммов; при этом доля Beijing была значимо выше среди штаммов, высокорезистентных к офлоксацину, в сравнении с чувствительными ($p = 0,03$). Однако возможно, что в данном случае речь идёт не столько об ассоциации Beijing с высоким уровнем устойчивости к офлоксацину, сколько о доминировании Beijing среди МЛУ-штаммов.

В 2006 г. в различных регионах северо-запада России доля резистентных к офлоксацину штаммов *M. tuberculosis* находилась в диапазоне 1,1–1,6% среди впервые выявленных больных ТБ и 4,1–10,3% — среди ранее леченных больных [15]. Анализ структуры лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* среди впервые выявленных больных ТБ на северо-западе России за 2010–2021 гг. показал быстрый (в 2,5 раза) рост лекарственной устойчивости к рифампицину в сочетании с фторхинолонами (с 2,4%; 95% доверительный интервал (ДИ) 2,2–2,6 до 6,1%; 95% ДИ 5,6–6,6) [19].

В связи с распространением МЛУ-ТБ и применением препаратов 2-го ряда важным для клинической практики является тестирование чувствительности возбудителя к фторхинолонам, помимо изониазида и рифампицина.

Учитывая рост доли МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных пациентов в России, было актуальным изучить особенности распространения мутаций в генах, обуславливающих резистентность к группе фторхинолонов, в современный период.

Целью настоящего исследования была молекулярная характеристика ретроспективной коллекции офлоксацин-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* от впервые выявленных больных ТБ на северо-западе России.

Материалы и методы

Коллекция исследования включала 599 изолятов *M. tuberculosis* из рабочей коллекции бактериологической лаборатории Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, выделенных в 2015–2019 гг. от ранее не леченных больных ТБ, проживающих в различных регионах северо-запада России.

Культивирование и определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к основным

противотуберкулёзным препаратам проводили стандартным непрямом методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах и с помощью модифицированного метода пропорций на жидкой среде в системе с автоматизированной детекцией роста к противотуберкулёзным препаратам «ВАСТЕС MGIT960» («Becton Dickinson»). Используемые критические концентрации препаратов составляли 1,0 мкг/мл для стрептомицина, 0,1 мкг/мл для изониазида, 5,0 мкг/мл для этамбутола, 1,0 мкг/мл для рифампицина, 100 мкг/мл для пипразинамида, 1,0 мкг/мл для амикацина, 2,5 мкг/мл для капреомицина, 2,0 мкг/мл для офлоксацина, 5 мкг/мл для этионамида³.

ДНК выделяли из чистых культур *M. tuberculosis*, как описано ранее [15]. Для определения генотипической устойчивости к фторхинолонам применяли метод мультиплексной ПЦР (наборы «Ампли-туб-МЛУ-РВ» и «Ампли-туб-ФQ-РВ» («Синтол»).

Принадлежность к генотипу Beijing и его субтипам B0/W148, Central Asian/Russian, CAO, Beijing 1071-32-кластер, 14717-15-кластер определяли методами ПЦР и ПЦР в реальном времени для выявления специфических маркеров [20]. Штаммы других генетических групп (не-Beijing) сполитотипировали [21]. Полученные сполитографы сравнивали с международной базой SITVIT² и определяли номер SIT (англ. Spoligotype International Type).

Статистический анализ проводили с использованием ресурса MedCalc⁵. Разницу данных между группами определяли по критерию χ^2 , статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка лекарственной чувствительности 599 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных ТБ, показала что 292 (48,7%) штамма были чувствительными ко всем противотуберкулёзным препаратам 1-го ряда (стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу), 230 (38,4%) изолятов обладали МЛУ. Фенотипическая устойчивость к офлоксацину установлена у 6,7% (40/599) штаммов в общей популяции и у 17,4% (40/230) МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*. Согласно новому определению ВОЗ, все 40 устойчивых к офлоксацину штаммов были пре-ШЛУ (табл. 1).

Генотипирование показало, что в общей коллекции штаммов *M. tuberculosis* доля генотипа Beijing составила 57,8% (346/599). Остальные 253 штамма принадлежали к различным генетическим семействам евро-американской филогенети-

³ Приказ Минздрава России от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».

⁴ SITVIT2.

⁵ URL: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>

⁵ MedCalc. URL: http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php

Таблица 1. Споллигопрофили 40 офлоксацин-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*

Table 1. Spoligoprofiles of 40 ofloxacin-resistant *M. tuberculosis* strains

SIT, семейство SIT, family	43-споллигопрофиль 43-spoligoprofile	Количество штаммов Number of strains	Мутация в <i>gyrA</i> <i>gyrA</i> mutation
SIT1 Beijing	□□■	34	19 — <i>Asp94Gly</i> 8 — <i>Ala90Val</i> 3 — <i>Asp94Ala</i> 2 — <i>Ser91Pro</i> 1 — нет no
SIT42 LAM	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	2	1 — <i>Ala90Val</i> 1 — <i>Asp94Gly</i>
SIT252 LAM	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1	<i>Asp94Gly</i>
SIT4 LAM*	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1	<i>Asp94Gly</i>
SIT53 L4-unclassified	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1	<i>Asp94Gly</i>
SIT251 L4-unclassified	■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■	1	<i>Ala90Val</i>

Примечание. *Штамм SIT4 относится к генотипу LAM на основании 24-MIRU-VNTR-типирования и кластеризации с референс-профилями базы данных MIRU-VNTRplus.org.

Note. *Strain SIT4 belongs to the LAM genotype based on 24-MIRU-VNTR typing and clustering with reference profiles from the MIRU-VNTRplus.org database.

ческой линии *M. tuberculosis* (другое название — линия 4), преимущественно к T (31,6%; 80/253), LAM (Latin American Mediterranean) (25,3%; 64), Ural (22,9%; 58) и Haarlem (9,9%; 25). Кластеры Central Asian/Russian (включая субтип CAO) и B0/W148 генотипа Beijing включали 34,2% (205/599) и 17,4% (104) штаммов соответственно.

Офлоксацин-устойчивые штаммы были представлены преимущественно (85%; 34/40) генотипом Beijing. При этом 18 (45%) штаммов были отнесены к наиболее известному российскому эпидемиологическому субтипу Beijing B0/W148-кластер, 12 (30%) — к Beijing Central Asian/Russian. Из последних 2 штамма представляли субтип CAO, более характерный для Средней Азии и достаточно редкий в

России [20, 22]. Все штаммы Beijing имели споллиготип SIT1, 1 штамм относился к древней сублинии (кластер 1071-32), остальные — к современной сублинии генотипа Beijing. Выявлены также 4 штамма генотипа LAM и 2 штамма со споллиготипами SIT53 и SIT251, которые, согласно базе данных SITVIT2, относятся к группе T. Принимая во внимание гетерогенность и полифилетичность как группы T в целом, так и споллиготипа SIT53 [23, 24], более корректно определять эти штаммы как L4-unclassified.

Мутации в гене *gyrA* обнаружены у 97,5% (39/40) штаммов *M. tuberculosis* (табл. 2). Наиболее часто мутации обнаруживали в кодоне 94 (69,2%; 27/39), они были представлены 3 вариантами одно-

Таблица 2. Мутации в гене *gyrA* офлоксацин-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*

Table 2. Mutations in the *gyrA* gene in ofloxacin-resistant *M. tuberculosis* strains

Мутации в гене <i>gyrA</i> <i>gyrA</i> mutation	Все штаммы All strains	Beijing, все Beijing, all	Beijing B0/W148	Beijing Central Asian/Russian*	Beijing, другие** Beijing, other**	non-Beijing
<i>n</i>	40	34	18	12	4	6
<i>Ala90Val</i>	10 (25%)	8	5	2	1	2
<i>Ser91Pro</i>	2 (5%)	2	1	1		
<i>Asp94Gly</i>	23 (57,5%)	19	10	7	2	4
<i>Asp94Ala</i>	3 (7,5%)	3	1	1	1	
<i>Asp94Tyr</i>	1 (2,5%)			1		
Не выявлено Not detected	1 (2,5%)	1	1			

Примечание. *2 штамма Beijing Central Asian/Russian относились к субтипу CAO и имели мутации *Ala90Val* и *Ser91Pro*. **1 штамм относился к 1071-32-кластеру древней сублинии генотипа Beijing и имел мутацию *Ala90Val*.

Note. *2 Beijing Central Asian/Russian strains belonged to the CAO subtype and had *Ala90Val* and *Ser91Pro* mutations. **1 strain belonged to the 1071-32 cluster of the ancient sublineage of the Beijing genotype and had the *Ala90Val* mutation.

нуклеотидных полиморфизмов, среди которых замена Asp94Gly выявлена в 57,5% (23/40) штаммов, устойчивых к офлоксацину, и доминировала среди штаммов как Beijing (19/34), так и не-Beijing (4/6). Второй по частоте была замена Ala90Val (25%, 10/40) которая была установлена у 23,5% (8/34) штаммов Beijing и 33,3% (2/6) штаммов не-Beijing. Суммарно штаммы *M. tuberculosis* с мутациями Asp94Gly и Ala90Val в гене *gyrA* составили 82,5% (33/40). Одновременного наличия 2 мутаций в 1 штамме не выявлено.

При анализе полиморфизма гена *gyrA* следует учитывать, что не все мутации, даже в кодонах, соседних с горячими участками, имеют отношение к устойчивости. Наиболее известной филогенетической заменой является мутация в *gyrA95*, предложенная в качестве эволюционного маркера еще в 1997 г. для самой первой схемы разделения вида *M. tuberculosis* на главные генетические группы [25]. В настоящее время в качестве современного источника информации о значимости мутаций устойчивости (или её отсутствии) можно обратиться к КATALOGУ мутаций ВОЗ, второе издание которого вышло в 2023 г. [14]. Перечисление этого кодона *gyrA95* в одном ряду с мутациями в горячем участке гена *gyrA* [7, 26] создаёт ошибочное впечатление о его корреляции с устойчивостью к фторхинолонам.

Анализ офлоксацин-устойчивых штаммов различных генотипов выявил все варианты обнаруженных мутаций в гене *gyrA* у штаммов субтипа Beijing Central Asian/Russian. Более половины офлоксацин-устойчивых штаммов Beijing B0/W148 (10/18) и Central Asian/Russian (7/12) имели мутацию Asp94Gly. Значимых различий в спектре мутаций в зависимости от генотипа *M. tuberculosis* не выявлено.

В исследованной выборке 40 больных, от которых были выделены офлоксацин-устойчивые штаммы *M. tuberculosis*, преобладали клинические формы инфильтративного и диссеминированного ТБ лёгких (16 и 14 больных соответственно; табл. 3). Сравнение клинических форм заболевания и генотипа штаммов не выявило статистически значимых различий. При этом доля диссеминированного ТБ

лёгких была больше у больных при инфицировании штаммами Central Asian/Russian (41,7%; 5/12), чем B0/W148 (27,8%; 5/18; $p = 0,4$). Доля больных с инфильтративным ТБ лёгких была больше в группе B0/W148 (55,6%; 10/18), чем Central Asian/Russian (33,3%; 4/12; $p = 0,2$). Возможно, статистически незначимые различия между группами обусловлены малым размером выборки или разной реактивностью макроорганизма пациентов.

Мы сравнили полученные результаты с предыдущими российскими работами [7, 8, 15, 26, 27]. Как и в нашем исследовании, наиболее частыми, независимо от региона России, были мутации *gyrA* 94Gly, 90Val, 94Ala. Во втором издании Каталога ВОЗ [15], опубликованном в 2023 г. применительно к новому фторхинолону моксифлоксацину наиболее частая из этих мутаций *gyrA* — Asp94Gly — определена как приводящая с высокой достоверностью к высокому уровню устойчивости к моксифлоксацину, наряду с *gyrA Gly88Cys*, *Asp94Asn*, *Asp94His* и *Asp94Tyr*. Другие мутации в *gyrA* и *gyrB* определены как приводящие к низкому уровню устойчивости к моксифлоксацину.

Мутации *gyrB*, которые не включены в использованную нами тест-систему, как правило, редкие [8, 15] или вообще не были выявлены в некоторых локальных коллекциях [26], хотя, например, обнаружены в 10% офлоксацин-устойчивых штаммов в Ленинградской области [18]. Некоторое количество офлоксацин-устойчивых штаммов не несёт мутаций в *gyrA* или *gyrB* [15, 18]. Их устойчивость к офлоксацину может быть гипотетически объяснена мутацией другого гена-мишени или активным эффлюксом [28, 29].

Обратная ситуация, а именно множественные мутации в одном и том же штамме, в изученной выборке не наблюдалась, но была описана ранее в других российских работах. Например, в исследовании коллекции из различных регионов России 4 изолята несли одновременно мутации *gyrA Asp94Gly* и *gyrB Asn538Asp*, 1 штамм Beijing B0/W148 имел одновременно мутации *gyrA* (Ala90Val-Ser91Pro, Asp94Asn) и мутацию *gyrB* (Ala543Val) [7]. При этом отсутствует корреляция между уровнем фенотипиче-

Таблица 3. Клинические формы заболевания больных туберкулезом и генотипы штаммов

Table 3. Clinical forms of the disease in tuberculosis patients and strain genotypes

Клинические формы ТБ Clinical forms of tuberculosis	Всего Total	B0/W148-cluster	Central Asian/ Russian	Beijing другие Beijing, other	non-Beijing
<i>n</i>	40	18	12	4	6
Диссеминированный Disseminated	14	5	5		4
Инфильтративный Infiltrative	16	10	4	1	1
Фиброзно-кавернозный Fibrous-cavernous	6	2	2	1	1
Кавернозный Cavernous	2	1		1	
Очаговый Focal	2		1	1	

ской устойчивости и типом мутации или наличием более чем 1 мутации. В Ленинградской области в 2011 г. 54,3% изолятов с низким уровнем (2 мкг/мл) и 76,9% изолятов с высоким уровнем (10 мкг/мл) устойчивости к офлоксацину имели мутации в *gyrA* [18]. Два изолята с низким уровнем устойчивости к офлоксацину имели мутации в генах *gyrA* и *gyrB* одновременно, а основные мутации в кодонах *gyrA* 94 и 90 были обнаружены среди штаммов как с высоким, так и с низким уровнем устойчивости [18]. Это противоречит утверждению в Каталоге ВОЗ [14] о том, что «множественные генетически связанные мутации с низким уровнем устойчивости к моксифлоксацину имеют аддитивный эффект и должны рассматриваться как придающие высокий уровень устойчивости». Гипотетически множественные мутации могли возникнуть из-за мутаторных (гипермутабельных) аллелей генов репарации ДНК в таких штаммах, аналогично ситуации с устойчивостью к рифампицину и множественными мутантными аллелями *rpoB* [30].

Интересным результатом предыдущего исследования на северо-западе России стало обнаружение высокой доли гетерорезистентных изолятов, т.е. имеющих как мутантные аллели, так и аллели дикого типа *gyrA* [15]. Однако в нашем новом исследовании такие случаи не были выявлены, т.е. в настоящее время происходит активное распространение штаммов с уже стойко приобретённой устойчивостью к офлоксацину.

Заключение

Широкое использование в прошлом фенотипического тестирования лекарственной устойчивости на основе данных метода абсолютных концентраций, возможно, привело к получению ложных результатов, что дополнительно повышает важность и необходимость генетического типирования. В новую версию методических рекомендаций [13] были включены дополнительные положения, устанавливающие приоритет метода пропорций перед методом абсолютных концентраций в фенотипическом тестировании чувствительности клинических изолятов *M. tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам. Согласно рекомендациям ВОЗ были изменены критические концентрации при тестировании с использованием технологии ВАСТЕС MGIT для рифампицина (0,5 мг/л вместо 1 мг/л), левофлоксацина (1,0 мг/л вместо 1,5 мг/л), моксифлоксацина (0,25 и 1 мг/л вместо 0,5 и 2,0 мг/л). Это затрудняет ретроспективное сравнение данных фенотипической лекарственной чувствительности и дополнительно усиливает роль молекулярно-генетических исследований, направленных на установление генетических маркеров устойчивости.

В изученной выборке штаммов *M. tuberculosis* из различных регионов северо-запада России в

2015–2019 гг. первичная резистентность к фторхинолонам составляла 6,7% в общей популяции и 17,4% у МЛУ-штаммов и была обусловлена преимущественно мутациями Asp94Gly и Ala90Val в гене *gyrA*. Наибольшая доля резистентных к фторхинолонам штаммов *M. tuberculosis* представлена генотипом Beijing B0/W148.

В популяции *M. tuberculosis* на северо-западе России в настоящий момент формируется устойчивость к фторхинолонам на фоне уже существующей МЛУ, и штаммы с мутациями Asp94Gly и Ala90Val в гене *gyrA* играют основную роль в распространении пре-ШЛУ-ТБ. Целесообразно проводить детекцию мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам, и слежение за циркуляцией данных генотипов для оценки их эпидемиологической значимости.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Raviglione M.C., Smith I.M. XDR tuberculosis – implications for global public health. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(7):656–9. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmp068273>
- Smith S.E., Ershova J., Vlasova N., et al. Risk factors for acquisition of drug resistance during multidrug-resistant tuberculosis treatment, Arkhangelsk Oblast, Russia, 2005–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21(6):1002–11. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2106.141907>
- Takiff H.E., Salazar L., Guerrero C., et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38(4):773–80. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773>
- Aubry A., Veziris N., Cambau E., et al. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(1):104–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.50.1.104-112.2006>
- Mdluli K., Ma Z. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2007;7(2):159–68. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152607781001763>
- Feuerriegel S., Cox H. S., Zarkua N., et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(8):3353–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00050-09>
- Panova A.E., Vinokurov A.S., Shemetova A.A., et al. Molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistant isolates from HIV- and HIV+ tuberculosis patients in Russia. *BMC Microbiol.* 2022;22(1):138. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02553-7>
- Nosova E.Y., Bukatina A.A., Isaeva Y.D., et al. Analysis of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin. *J. Med. Microbiol.* 2013;62 (Pt. 1):108–13. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.046821-0>
- Maruri F., Sterling T.R., Kaiga A.W., et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67(4):819–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr566>
- Vyazovaya A., Levina K., Zhuravlev V., et al. Emerging resistant clones of *Mycobacterium tuberculosis* in a spatiotemporal

- context. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018;73(2):325–31.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx372>
11. Mujuni D., Kasemire D.L., Ibanda L., et al. Molecular characterisation of second-line drug resistance among drug resistant tuberculosis patients tested in Uganda: a two and a half-year's review. *BMC Infect. Dis.* 2022;22(1):363.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07339-w>
 12. Li S, Tan Y, Deng Y, et al. The emerging threat of fluoroquinolone-, bedaquiline-, and linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China: Observations on surveillance data. *J. Infect. Public Health.* 2024;17(1):137–42.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.11.018>
 13. Методические рекомендации «Тестирование лекарственной чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом пропорций» Российское общество фтизиатров. М.;2022. Methodological recommendations “Drug sensitivity testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* using the proportion method” Russian Society of Phthisiatrists. Moscow;2022.
 14. WHO. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva;2023.
 15. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O., et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(8):2937–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00036-08>
 16. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., et al. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(5):1417–24.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1417-1424.2002>
 17. Narvskaya O., Mokrousov I., Otten T., Vishnevsky B. Molecular markers: application for studies of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia. In: Read M.M., ed. *Trends in DNA Fingerprinting Research*. N.Y.;2005:111–25.
 18. Chernyaeva E., Fedorova E., Zhemkova G., et al. Characterization of multiple and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with different ofloxacin-resistance levels. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2013;93(3):291–5.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.02.005>
 19. Галкин В.Б., Стерликов С.А., Бельтюков М.В. Структура и динамика развития лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Северо-западном федеральном округе в 2010–2021 гг. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики*. 2023;(1):1–20. Galkin V.B., Sterlikov S.A., Beltyukov M.V. Structure and dynamics of drug resistance of *Mycobacteria tuberculosis* in the North-Western federal district of Russia in 2010–2021. *Current Problems of Health Care and Medical Statistics*. 2023;(1):1–20.
DOI: <https://doi.org/10.24412/2312-2935-2023-1-1-20>
EDN: <https://elibrary.ru/brnfyk>
 20. Vyazovaya A., Gerasimova A., Mudarisova R., et al. Genetic diversity and primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains in Northwestern Russia. *Microorganisms*. 2023;11(2):255.
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020255>
 21. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(4):907–14.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>
 22. Shitikov E., Vyazovaya A., Malakhova M., et al. Simple assay for detection of the Central Asia outbreak clade of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J. Clin. Microbiol.* 2019;57(7):e00215-19.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00215-19>.
 23. Mokrousov I. Ubiquitous and multifaceted: SIT53 spoligotype does not correlate with any particular family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2021;126:102024.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102024>
 24. Coll F., McNeerney R., Guerra-Assunção J.A., et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat. Commun.* 2014;5:4812.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms5812>.
 25. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997;94(18):9869–74.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9869>
 26. Dymova M.A., Cherednichenko A.G., Alkhovik O.I., et al. Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Siberia. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:478. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-478>
 27. Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Киселева Е.А. и др. Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика культур *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в Европейской части Российской Федерации в 1998–2003 гг. и 2016–2021 гг. *Туберкулез и болезни легких*. 2023;101(3):27–36. Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Kiseleva E.A., et al. Comparative molecular genetic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* cultures isolated in the European Part of the Russian Federation in 1998–2003 and 2016–2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2023;101(3):27–36.
DOI: <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-3-27-36>
EDN: <https://elibrary.ru/tbicpz>
 28. Huang T.S., Kunin C.M., Shin-Jung Lee S., et al. Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre: 1995–2003. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;56(6):1058–62.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dki353>
 29. Escribano I., Rodriguez J.C., Llorca B., et al. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemotherapy*. 2007;53(6):397–401. DOI: <https://doi.org/10.1159/000109769>
 30. Mokrousov I. Multiple rpoB mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and second-order selection. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10(7):1337–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1007.030598>

Информация об авторах

Вязовая Анна Александровна[✉] — д.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, elmtree2001@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>

Соловьева Наталья Сергеевна — к.м.н., зав. бактериологической лаб. Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1509-0734>

Герасимова Алена Андреевна — м.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5246-8658>

Information about the authors

Anna A. Vyazovaya[✉] — D. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, elmtree2001@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>

Natalia S. Solovieva — Cand. Sci. (Med.), Head, Bacteriological laboratory, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1509-0734>

Alena A. Gerasimova — junior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5246-8658>

Журавлев Вячеслав Юрьевич — к.м.н., в.н.с., координатор направления «Лабораторная диагностика» Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6906-6225>

Мокроусов Игорь Владиславович[✉] — д.б.н., зав. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, imokrousov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5924-0576>

Участие авторов: *Вязовая А.А.* — дизайн исследования, генетическое исследование, статистическая обработка, написание; *Соловьева Н.С.* — микробиологическое исследование; *Герасимова А.А.* — генетическое исследование; *Журавлев В.Ю.* — участие в подготовке рукописи и её редактирование; *Мокроусов И.В.* — написание и редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 17.03.2024;
принята к публикации 15.05.2024;
опубликована 29.06.2024

Viacheslav Yu. Zhuravlev — Cand. Sci. (Med., leading researcher, Coordinator of the direction "Laboratory diagnostics", St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6906-6225>

Igor V. Mokrousov[✉] — D. Sci. (Biol., Head, Laboratory of Molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, imokrousov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5924-0576>

Author contribution: *Vyazovaya A.A.* — study design, genetic study, statistical processing, writing; *Solovieva N.S.* — microbiological examination; *Gerasimova A.A.* — genetic research; *Zhuravlev V.Yu.* — participation in the preparation of the manuscript and its editing; *Mokrousov I.V.* — writing and editing the manuscript. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 17.03.2024;
accepted for publication 15.05.2024;
published 29.06.2024



Обнаружение и типовая идентификация неполиомиелитных энтеровирусов у детей на фоне острых кишечных инфекций различной этиологии: 2018–2023 гг.

Селиванова С.Г.[✉], Зверев В.В., Пономарева Н.В., Леонов А.В., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Полянина А.В., Новикова Н.А.

Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Аннотация

Введение. Энтеровирусы (ЭВ) характеризуются видовым и типовым разнообразием, полиморфизмом клинических проявлений, склонностью к эпидемическому распространению, часто являются причиной вспышек заболеваний, что определяет актуальность мониторинга штаммов ЭВ при разных клинических формах инфекции, в том числе в условиях проведения противоэпидемических мероприятий.

Цель исследования — характеристика распространённости и типового разнообразия неполиомиелитных ЭВ (НПЭВ) у детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ) в период 2018–2023 гг., включающий пандемию COVID-19.

Материалы и методы. Методом ОТ-ПЦР исследовано 7302 образца фекалий детей, госпитализированных с диагнозом ОКИ в инфекционный стационар Нижнего Новгорода. Генотипирование штаммов ЭВ проводили методом фрагментного секвенирования по Сэнгеру области генома, кодирующей капсидный белок 1 (VP1), и онлайн-ресурса BLAST.

Результаты. ЭВ обнаружены в $5,0 \pm 0,3\%$ (1,7–7,8%) случаев как в моноинфекции, так и в сочетании с вирусами кишечной группы. Многолетняя динамика частоты обнаружения ЭВ и заболеваемости ЭВ-инфекцией детей в Нижегородской области характеризовалась резким снижением показателей в 2020 г. на фоне введения противоэпидемических мероприятий. При генотипировании 299 штаммов идентифицирован 41 тип НПЭВ 4 видов. Спектр включал основных возбудителей экзантемных и нейроинфекций и редкие типы, встречающиеся при «малой» или кишечной формах инфекции. В изучаемый период установлено перераспределение видов НПЭВ. До пандемии соотношение видов *Enterovirus A* : *Enterovirus B* : *Enterovirus C* было следующим — 41,0 : 46,7 : 12,3%; в сезон пандемии 2020 г. — 0,0 : 37,5 : 62,5%; после снятия ограничительных мер — 47 : 29 : 23%, что может быть связано с различной эффективностью влияния ограничительных мероприятий на механизмы передачи ЭВ разных видов.

Заключение. Генетическое разнообразие НПЭВ, выявляемых у детей с ОКИ, дополняет информацию о типовом составе территориальной ЭВ-популяции. У детей с ОКИ в условиях блокировки аспирационного механизма передачи SARS-CoV-2 наблюдалось снижение частоты обнаружения вирусов вида *Enterovirus B*, отсутствие выявления *Enterovirus A* и постоянное присутствие *Enterovirus C*.

Ключевые слова: неполиомиелитные энтеровирусы, генотипирование, острая кишечная инфекция

Этическое утверждение. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике при Нижегородском научно-исследовательском институте им. академика И.Н. Блохиной (протокол № 5 от 24.03.2020). У всех пациентов, включённых в исследование, или их законных представителей было получено добровольное информированное согласие на использование данных лабораторных анализов в научных целях.

Благодарность. Авторы выражают признательность Л.Н. Голицыной за консультативную помощь при написании статьи.

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: Селиванова С.Г., Зверев В.В., Пономарева Н.В., Леонов А.В., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Полянина А.В., Новикова Н.А. Обнаружение и типовая идентификация неполиомиелитных энтеровирусов у детей на фоне острых кишечных инфекций различной этиологии: 2018–2023 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):351–361.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-513>

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

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-513>

Detection and type identification of non-polio enteroviruses in children against the background of acute intestinal infections of various etiologies: 2018–2023

Svetlana G. Selivanova[✉], Vladimir V. Zverev, Natalya V. Ponomareva, Artem V. Leonov, Alexander Yu. Kashnikov, Natalia V. Epifanova, Anastasia V. Polyanaia, Nadezhda A. Novikova

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

Introduction. Enteroviruses (EV) are characterized by: species and type diversity, polymorphism of clinical manifestations, a tendency to epidemic spread, and are often the cause of disease outbreaks, which determines the relevance of monitoring EV strains in various clinical forms of infection, including in conditions of anti-epidemic measures.

The **aim** of the study: to characterize the prevalence and diversity of non-polio enteroviruses (NPEV) types in children with acute intestinal infection (All) in the period 2018–2023, including the COVID-19 pandemic.

Materials and methods. The RT-PCR method was used to study 7302 samples of feces from children hospitalized with a diagnosis of All in the infectious diseases hospital of Nizhny Novgorod. Genotyping of EV strains was carried out using fragment Sanger sequencing of the genome region encoding capsid protein 1 (VP1) and the online resource BLAST.

Results. EVs were found in $5.0 \pm 0.3\%$ (1.7–7.8%), both in mono- and mixed infections with other enteric viruses. The long-term dynamics of the frequency of EV detection and the incidence of EV infection in children in the Nizhny Novgorod region was characterized by a sharp decrease in indicators in 2020 against the backdrop of the introduction of anti-epidemic measures. When genotyping 299 strains, 41 types of NPEV of 4 species were identified. The spectrum included the main pathogens of exanthema and neuroinfections and rare types found in “minor” or intestinal forms of infection. During the study period, a redistribution of NPEV species was established. Before the pandemic, the ratio of *Enterovirus A* : *Enterovirus B* : *Enterovirus C* species was as follows — 41.0 : 46.7 : 12.3%; during the 2020 pandemic season the ratio was 0.0 : 37.5 : 62.5%; after the lifting of restrictive measures — 47 : 29 : 23%, which may be due to the different effectiveness of the restrictive measures on the mechanisms of transmission of EVs of different types.

Conclusion. The genetic diversity of NPEVs detected in children with All complements information on the typical composition of the territorial enterovirus population. In children with All, when the airborne transmission of SARS-CoV-2 was blocked, there was a decrease in the frequency of detection of viruses of the *Enterovirus B* type, the absence of detection of *Enterovirus A* and the constant presence of *Enterovirus C*.

Keywords: Non-polio enteroviruses, genotyping, All

Ethics approval. The protocol of the study was approved by the local Ethics Committee of the Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 5, March 24, 2020). Voluntary informed consent was obtained from all patients included in the study or their legal representatives for the use of laboratory test data for scientific purposes.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to L.N. Golitsyna for consultative assistance in writing the article.

Funding source. The authors declare that there was no external funding for the study.

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

For citation: Selivanova S.G., Zverev V.V., Ponomareva N.V., Leonov A.V., Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Polyanaia A.V., Novikova N.A. Detection and type identification of non-polio enteroviruses in children against the background of acute intestinal infections of various etiologies: 2018–2023. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2024;101(3):351–361.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-513>

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

Введение

Энтеровирусы (*Picornavirales: Picornaviridae: Enterovirus*; ЭВ) — мелкие (диаметр 30 нм), без-оболочечные, с икосаэдрическим типом симметрии

(pseudo T = 3) капсида (+)РНК-содержащие вирусы. Важную роль в инфекционной патологии человека играют неполиомиелитные ЭВ (НПЭВ), представленные более чем 100 типами, относящимися

к 4 видам: *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*¹. В большинстве случаев инфицирование НПЭВ протекает бессимптомно, однако эти вирусные агенты также могут быть связаны с поражением центральной нервной системы, миокардитом, неонатальным сепсисом, другими тяжёлыми заболеваниями [1–4]. Важно отметить, что НПЭВ разных видов и типов могут являться причиной одних и тех же клинических синдромов, а кишечная форма ЭВ-инфекции (ЭВИ) может сопровождать инфицирование любым типом ЭВ [5].

Немаловажную роль ЭВ играют в возникновении эпидемических подъёмов и вспышечной заболеваемости, которые регистрируются на территории многих стран. Например, масштабная вспышка ЭВ-D68-респираторного заболевания с неврологическим синдромом была зафиксирована в 2014 г. в США и Европе [6, 7], кроме того, регистрируются периодические подъёмы заболеваемости экзантемой полости рта и конечностей (ЭВ-A71-инфекция) в Азиатско-Тихоокеанском регионе [8] и серозным менингитом (ЭВМ) в Европе, США, России (КВЗ, ЕСНО30) [9–11].

Разнообразие клинических симптомов разной степени тяжести, риск появления и широкого распространения среди населения эпидемических вариантов вируса определяют актуальность исследований во всём мире, направленных на молекулярно-генетический мониторинг циркуляции штаммов ЭВ² [12]. В России слежение за циркуляцией НПЭВ является неотъемлемой частью эпидемиологического надзора за ЭВИ³, позволяющего прогнозировать эпидемические подъёмы заболеваемости и формирование очагов инфекции, своевременно принимать управленческие решения.

Ранее нами была показана значимость обследования детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ) для молекулярного мониторинга циркуляции ЭВ. Ежегодное выявление и разнообразный типовой пейзаж НПЭВ, включающий не только ЭВ видов *Enterovirus A* и *Enterovirus B* (возбудители герпангины, экзантемы, серозного менингита, др.), но и скрыто циркулирующих НПЭВ вида *Enterovirus C* (в основном «малые» формы инфекции, острые респираторные вирусные инфекции, ОКИ), позволяют дополнительно получать данные, расширяющие

информацию об особенностях циркуляции ЭВ разных видов [13, 14].

В 2019 г. в г. Ухань (Китай) было зарегистрировано заболевание (COVID-19), вызванное новым коронавирусом (SARS-CoV-2), которое очень быстро распространилось по миру. В марте 2020 г. ВОЗ объявила о пандемии заболевания и необходимости введения противоэпидемических мероприятий, направленных на снижение активности распространения вируса, передающегося воздушно-капельным и контактно-бытовым путями⁴. Повсеместное введение режима чрезвычайной ситуации повлияло на заболеваемость не только COVID-19, но и другими инфекционными болезнями, преимущественно вирусной природы. Так, в Осло (Норвегия) в 2020–2021 гг. число госпитальных обращений детей с острыми бронхолитами, вирусными пневмониями, гастроэнтеритами и вирусными инфекциями центральной нервной системы сократилось на 90, 89, 74 и 78% соответственно по сравнению с предыдущими годами [15]. По данным японских исследователей, в период действия ограничительных мер число пациентов с гриппом, респираторно-синцитиальным вирусом, метапневмовирусом человека и микоплазменной пневмонией, сопровождающиеся респираторными симптомами, резко сократилось более чем на 98% [16]. В других исследованиях также сообщалось о снижении заболеваемости различными инфекциями вирусной этиологии у детей в период пандемии COVID-19, в том числе снизилась частота обнаружения кишечных вирусов (ротавирус — на 87%, норовирус — на 40%) [17].

В России в 2020 г. на фоне беспрецедентных противоэпидемических и профилактических мероприятий, направленных на борьбу с пандемией COVID-19, наблюдалось многократное снижение заболеваемости ЭВИ/ЭВМ. В 2021 и 2022 гг. отмечались постепенный рост заболеваемости и возвращение показателей к среднемуголетнему уровню, предшествующему пандемии (2010–2019 гг.) [18].

Цель работы — характеристика распространённости и типового разнообразия НПЭВ у детей с ОКИ в период 2018–2023 гг., включающий пандемию COVID-19.

Материалы и методы

В работе на наличие ЭВ и вирусов — возбудителей острого гастроэнтерита (ротавирусов, норовирусов, аденовирусов, астровирусов) исследовали 7302 образца фекалий детей в возрасте 0–17 лет,

¹ Picornaviridae Home Page. URL: <https://picornaviridae.com/ensavirinae/enterovirus/enterovirus.htm> (дата обращения: 13.03.2024).

² WHO. Enterovirus Surveillance Guidelines — guidelines for enterovirus surveillance in support of the polio eradication. Regional Office for Europe: World Health Organization. 2015. URL: <https://iris.who.int/handle/10665/344375> (дата обращения: 13.03.2024).

³ Программа «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции на 2023–2027 гг.». URL: https://fcgie.ru/page,3,koord_tsentr.html (дата обращения: 13.03.2024).

⁴ WHO. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. URL: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions> (дата обращения: 13.03.2024).

госпитализированных с диагнозом ОКИ (А08.4 — вирусная кишечная инфекция неуточнённая, МКБ-10) в детский инфекционный стационар Нижнего Новгорода в 2018–2023 гг.

У всех участников или их законных представителей получено добровольное информированное согласие. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной (протокол № 5 от 24.03.2020).

РНК энтеро-, рота-, норо-, астровирусов и ДНК аденовирусов из фекальных образцов выделяли с использованием набора реагентов «РИБО-преп», для обратной транскрипции применяли набор «РЕВЕРТА-Л» (ЦНИИ Эпидемиологии). Обнаружение РНК ЭВ и кишечных вирусов проводили с использованием тест-систем «АмплиСенс Enterovirus-FL», «АмплиСенс ОКИ виро-скрин-FL» согласно инструкциям производителя (ЦНИИ Эпидемиологии).

Пробы, содержащие РНК ЭВ, использовали для определения типа вируса. С этой же целью дополнительно были исследованы 123 ЭВ-содержащих образца фекалий детей с ОКИ, предоставленных ЦГиЭ в Нижегородской области в 2018–2023 гг.

Определение типа ЭВ проводили методом частичного секвенирования гена, кодирующего капсидный белок 1 (VP1). Фрагменты генома ЭВ размером 375 п.н. амплифицировали в соответствии с рекомендациями [19]. Нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК устанавливали в автоматическом режиме на приборах «GenomeLab GeXP» («Beckman Coulter») и «Нанофор-05» (Институт аналитического приборостроения РАН) с использованием наборов реагентов «DTCS Quick Start Kit» («Beckman Coulter») и «GenSek» (НПК «Синтол»).

Для идентификации близкородственных штаммов ЭВ анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов гена VP1 с использованием онлайн-ресурса BLAST⁵.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятым методом расчета средней ошибки (m) и показателя существенности и вероятности (t) по Стьюденту с помощью онлайн-калькулятора⁶.

Многолетнюю динамику заболеваемости ЭВИ детей в возрасте до 17 лет в Нижегородской области анализировали на основе данных официальной статистики (форма № 1 статистической отчетности «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») за 2018–2023 гг.

Результаты

Выявление энтеровирусов у детей с острой кишечной инфекцией

На наличие РНК ЭВ в фекалиях было обследовано 7302 ребёнка, госпитализированных с диагнозом ОКИ в 2018–2023 гг. Выявление ЭВ проводили в рамках этиологической расшифровки заболевания. Вирусы кишечной группы (ротавирусы, норовирусы, астровирусы, аденовирусы группы F) и ЭВ в сумме были обнаружены в 46,9% случаях (3424/7302), при этом ЭВ выявлялись как в «моноинфекции» (2,7%; 195/7302), так и в сочетании с вирусами — возбудителями острого гастроэнтерита (2,3%; 169/7302).

ЭВ обнаружены в 364 ($5,0 \pm 0,3\%$) случаях. В разные годы наблюдаемого периода частота обнаружения ЭВ у детей с ОКИ колебалась в пределах 1,7–7,8%. В период до пандемии COVID-19 ЭВ достоверно чаще выявлялись в 2018 г. ($7,5 \pm 0,7\%$; 120/1607; $p = 0,009$). В 2019 г. частота их обнаружения снизилась и достигла минимума в 2020 г. ($1,7 \pm 0,3\%$, 24/1427; $p = 0,0000001$), когда были введены ограничительные противоэпидемические мероприятия, связанные с пандемией. В 2021 г., после частичной отмены «локдауна» и при смягчении масочного режима, частота обнаружения ЭВ у детей с ОКИ достоверно увеличилась ($4,1 \pm 0,5\%$; 58/1417; $p = 0,00004$) и достигла максимума в 2022 г. ($7,8 \pm 0,9\%$; 65/832; $p = 0,002136$). На **рис. 1** видно, что

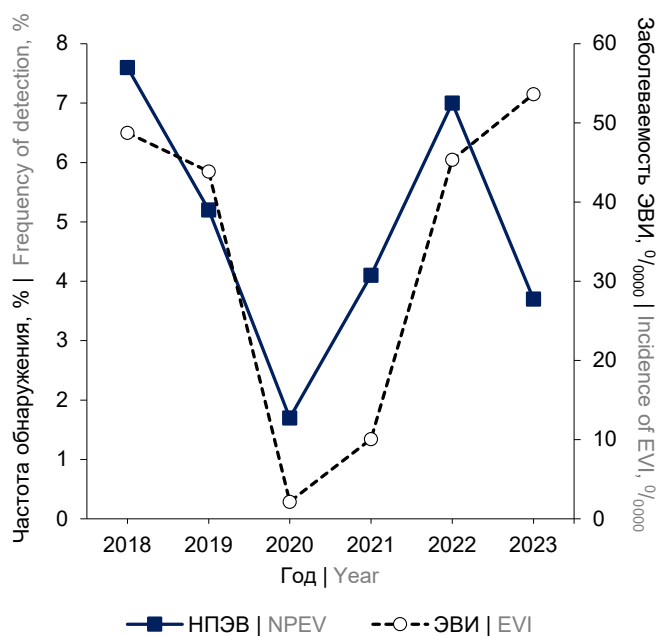


Рис. 1. Динамика частоты обнаружения НПЭВ (%) и заболеваемости ЭВИ (на 100 тыс. детей в возрасте до 17 лет) в Нижегородской области в 2018–2023 гг.

Fig. 1. Dynamics of the frequency of detection of NPEV (%) and incidence of EVI (per 100 thousand children under the age of 17 years) in the Nizhny Novgorod region in the period 2018–2023.

⁵ BLAST. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения 13.03.2024).

⁶ Медицинская статистика. URL: <https://medstatistic.ru/calculators/averagstudent.html> (дата обращения 13.03.2024).

динамика частоты обнаружения ЭВ до 2023 г. повторяет динамику заболеваемости всеми формами ЭВИ детей в Нижегородской области. Обе динамики имеют выраженное снижение показателей в 2020 г. и рост в 2021–2022 гг. Однако в 2023 г. рост заболеваемости ЭВИ продолжился, а частота обнаружения ЭВ у детей с ОКИ достоверно снизилась ($3,7 \pm 0,9\%$; 18/493; $p = 0,000001$) по сравнению с 2022 г. Сравнение показателей заболеваемости ЭВИ и ЭВМ в анализируемый период времени выявило, что рост заболеваемости в 2023 г. был обусловлен неменингеальными формами инфекции (в 2022 г. — $31,82\%_{/0000}$; в 2023 г. — $42,38\%_{/0000}$). Заболеваемость ЭВМ осталась приблизительно на том же уровне (в 2022 г. — $13,52\%_{/0000}$; в 2023 г. — $12,42\%_{/0000}$).

Проведён анализ помесечной частоты обнаружения ЭВ в разных возрастных группах детей с ОКИ в 2018–2022 гг. Установлено, что в 2018 и 2019 гг. динамика изменений частоты обнаружения ЭВ была однотипной. Аналогичная картина наблюдалась при сравнении сезонов 2021 и 2022 гг., что позволило выделить для сравнения объединённые сезоны 2018–2019 гг. (до пандемии) и 2021–2022 гг. (пандемия, отмена «локдауна»). Анализ показал, что до пандемии у детей с кишечной инфекцией ЭВ выявлялись круглогодично, начиная с апреля и заканчивая январем–февралем следующего года. Максимальные значения фиксировались в мае ($10,0\%$; 22/221) и сентябре ($15,8\%$; 38/241). В 2020 г. пик обнаружения ЭВ пришёлся на сентябрь ($5,7\%$; 7/123). В период пандемии 2021–2022 гг., после поэтапного снятия ограничительных мероприятий, ЭВ у детей с ОКИ выявлялись с июня по декабрь, с максимальной частотой обнаружения в июле ($10,8\%$; 34/315). В сезон 2023 г. ЭВ чаще выявлялись в августе ($8,2\%$; 6/73) (рис. 2).

НПЭВ-инфекции подвержены дети всех возрастов. В то же время частота обнаружения ЭВ у пациентов с ОКИ отличалась в разных возрастных группах в изучаемом периоде (рис. 3). Так, до пандемии COVID-19 ЭВ достоверно чаще, чем у детей от 3 до 7 лет, обнаруживался в возрастной группе до 3 лет ($7,3 \pm 0,6\%$; 120/1644; $p = 0,006739$), тогда как в 2021–2022 гг. наиболее часто ЭВ выявлялись у детей в возрасте 3–7 лет ($6,8 \pm 0,9\%$; 53/778; $p = 0,044991$) по сравнению с детьми старше 7 лет. В 2020 и 2023 гг. на фоне низкой частоты обнаружения ЭВ у детей с ОКИ достоверных различий в групповых показателях не установлено, при этом в сезон 2023 г. ЭВ у детей старше 7 лет выявлены не были, несмотря на то что число обследованных детей в возрасте 7–17 лет в 2022 и 2023 гг. отличалось мало (169 и 118 человек соответственно).

Представляло научно-практический интерес изучение особенностей типового состава ЭВ, обнаруженных у детей с ОКИ до пандемии COVID-19, в период пандемии и после её завершения.

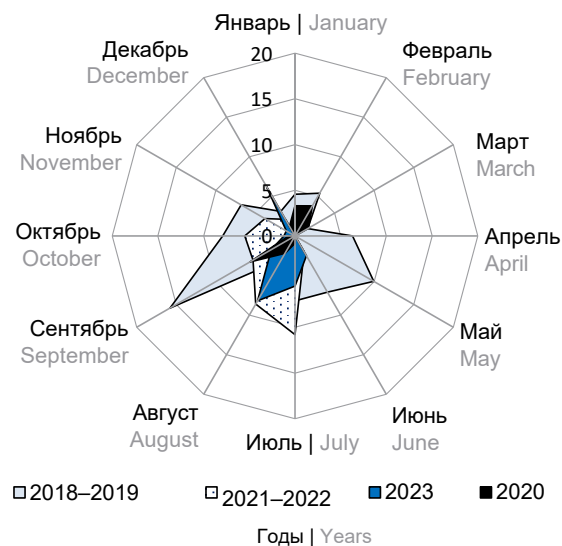


Рис. 2. Помесечная частота обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ до пандемии COVID-19 и после отмены «локдауна», %.

Fig. 2. Monthly frequency of detection of NPEV in children with All during the period before the COVID-19 pandemic and after the lifting of the lockdown, %.

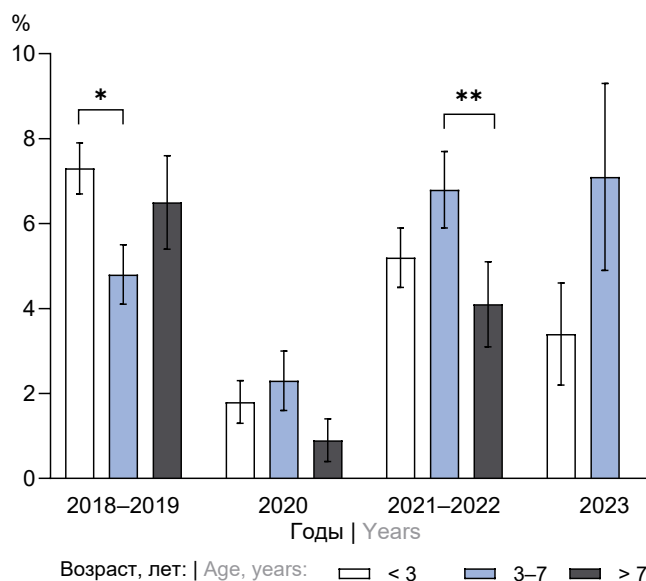


Рис. 3. Частота обнаружения ЭВ в разных возрастных группах детей с ОКИ в периоды до, во время и после пандемии COVID-19.

* $p = 0,006739$; ** $p = 0,044991$.

Fig. 3. Frequency of detection of EVs in different age groups of children with All in the periods before the pandemic, during and after the COVID-19 pandemic.

* $p = 0,006739$; ** $p = 0,044991$.

Анализ разнообразия типов НПЭВ у детей с ОКИ

С целью изучения разнообразия типов ЭВ, обнаруженных у госпитализированных с диагнозом ОКИ детей, проведён анализ 299 типированных штаммов. Все штаммы идентифицированы как НПЭВ.

Всего определён 41 тип НПЭВ, выявленных в 2018–2023 гг. На рис. 4, а видно, что ряд типов НПЭВ был установлен в единичном или небольшом числе случаев ($n = 64$: КА3, КА7, КА8, ЭВ-А76, ЭВ-А90, КВ1, КВ2, КВ3, КВ4, Е1, Е2, Е3, Е6, Е7, Е13, Е14, Е18, Е21, Е24, Е25, КА19, КА20, КА21, КА24, ЭВ-С99, ЭВ-С116, ЭВ-Д68), другие типы обнаруживались относительно часто ($n = 135$: КА2, КА5, КА10, ЭВА71, КА9, КВ5, Е9, Е11, Е30, КА22), 4 вируса являлись преобладающими ($n = 100$: КА4, КА6, КА16, КА1). Выявленные вирусы относились к 4 видам: *Enterovirus A* (44,5%; 133/299), *Enterovirus B* (35,1%; 105/299), *Enterovirus C* (20,1%; 60/299), *Enterovirus D* (0,3%; 1/299). Среди НПЭВ вида *Enterovirus A* идентифицированы 12 ти-

пов, при этом чаще обнаруживались вирусы КА4 (18,8%; 25/133), КА6 (14,3%; 19/133) и КА16 (15%; 20/133). Вид *Enterovirus B* включал 20 типов НПЭВ, доминирующее положение среди которых занимали вирусы КА9 (11,4%; 12/105), КВ5 (15,2%; 16/105), Е11 (14,3%; 15/105) и Е30 (13,3%; 14/105). Идентифицированы 8 типов НПЭВ вида *Enterovirus C*, где наиболее часто выявлялся вирус КА1 (60%; 36/60). В 1 случае в фекалиях обнаружена РНК вируса ЭВ-Д68.

Проведён анализ спектра типов НПЭВ в разные сезоны изучаемого периода (рис. 4, б). Так, до пандемии COVID-19 среди *Enterovirus A* доминирующее положение занимал ЭВ-А71 (13,3%; 14/105), который в последующем не был обнаружен, а на

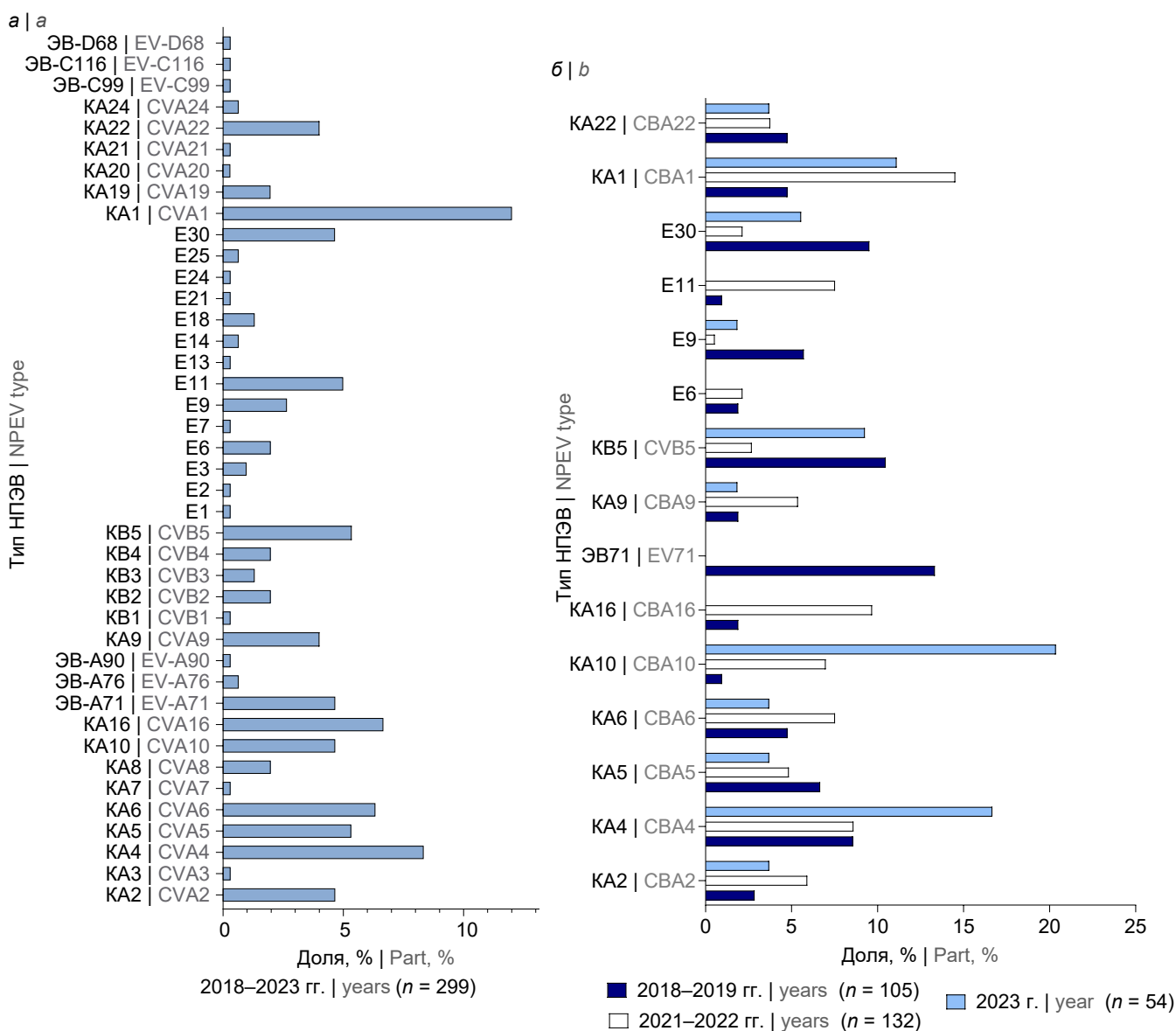


Рис. 4. Разнообразие типов НПЭВ, выявленных у детей с ОКИ в 2018–2023 гг. (а), до пандемии (2018–2019 гг.), в период пандемии (2021–2022 гг.) и после её окончания (2023 г.) (б).

Fig. 4. Diversity of NPEV types identified in children with All in 2018–2023 (а), before the pandemic (2018–2019), during the pandemic (2021–2022) and after its end (2023) (б).

смену ему пришёл вирус КА16 (13,6%; 18/132). В 2023 г. доминировали вирусы КА4 (16,7%; 9/54) и КА10 (20,4%; 11/54). Относительно часто выявлялись вирусы КА2, КА5 и КА6. Показательно, что в 2020 г., в условиях жестких противоэпидемических мероприятий, представители *Enterovirus A* не были идентифицированы.

В 2018–2019 гг. среди *Enterovirus B* чаще других обнаруживались вирусы KB5 (10,5%; 11/105), E30 (9,5%; 10/105) и E9 (5,7%; 6/105), в сезон 2020 г. в единичных случаях были обнаружены вирусы E9, E14 и E24, тогда как после частичного снятия ограничительных мер — вирусы КА9 (6,8%; 9/132) и E11 (10,6%; 14/132). В 2023 г. возобновилась циркуляция вируса KB5 (9,3%; 5/54), обнаружен вирус E30 (5,6%; 3/54), при этом другие возбудители ЭВМ (вирусы E6 и E11) не были выявлены в фекалиях детей с ОКИ.

Среди ЭВ вида *Enterovirus C* доминирующее положение как до пандемии, так и в период пандемии (во время действия ограничительных мероприятий и после отмены «локдауна») занимал вирус КА1. Стоит отметить, что в 2021–2022 гг. его доля в типовой структуре НПЭВ, выявленных у детей с ОКИ, составила 16% (21/132).

Проведён анализ распределения видов НПЭВ в разные сезоны изучаемого периода. На рис. 5 видно, что до пандемии COVID-19 ЭВ видов *Enterovirus A* ($41,0 \pm 4,8\%$; 43/105) и *Enterovirus B* ($46,7 \pm 4,9\%$; 49/105) выявлялись приблизительно в равных долях и статистически достоверно преобладали над *Enterovirus C* ($12,3 \pm 3,2\%$; 13/105; $p = 0,000001$), а после отмены «локдауна» (2021–2022 гг.) достоверно чаще обнаруживались *Enterovirus A* ($47,0 \pm 4,3\%$; 62/132; $p \leq 0,002142$). В период пандемии во время

действия жёстких ограничительных мер (2020 г.) ЭВ вида *Enterovirus A* не выявлялись, а основная доля среди идентифицированных НПЭВ принадлежала виду *Enterovirus C* ($62,5 \pm 17,1\%$; 5/8). В 2023 г. распределение видов НПЭВ существенно не отличалось от такового в 2021–2022 гг. и характеризовалось достоверным преобладанием *Enterovirus A*.

Таким образом, в изучаемый период у детей с ОКИ наблюдалось обусловленное сменой доминирующего типа изменение частоты обнаружения НПЭВ разных видов: до пандемии — *Enterovirus B* (46,7%), *Enterovirus A* (41,0%), *Enterovirus C* (12,3%); в сезон пандемии в период действия жёстких ограничений (2020 г.) выявлялись *Enterovirus C* (62,5%) и *Enterovirus B* (37,5%); после отмены «локдауна» — *Enterovirus A* (47,0%), *Enterovirus B* (28,8%), *Enterovirus C* (23,5%), *Enterovirus D* (0,7%); в 2023 г. — *Enterovirus A* (51,8%), *Enterovirus B* (27,8%), *Enterovirus C* (20,4%).

Обсуждение

ЭВ многих типов склонны к эпидемическому распространению, что определяет необходимость мониторинга их циркуляции. С этой целью проводят обнаружение и типовую идентификацию НПЭВ у заболевших с различной клинической картиной заболевания. В настоящем исследовании проводили обнаружение и идентификацию типов ЭВ у детей, госпитализированных с ОКИ в один из инфекционных стационаров Нижнего Новгорода, в рамках этиологической расшифровки заболевания в период, включающий время пандемии COVID-19.

В 2018–2023 гг. ЭВ как в моноинфекции, так и в сочетании с вирусами кишечной группы в сред-

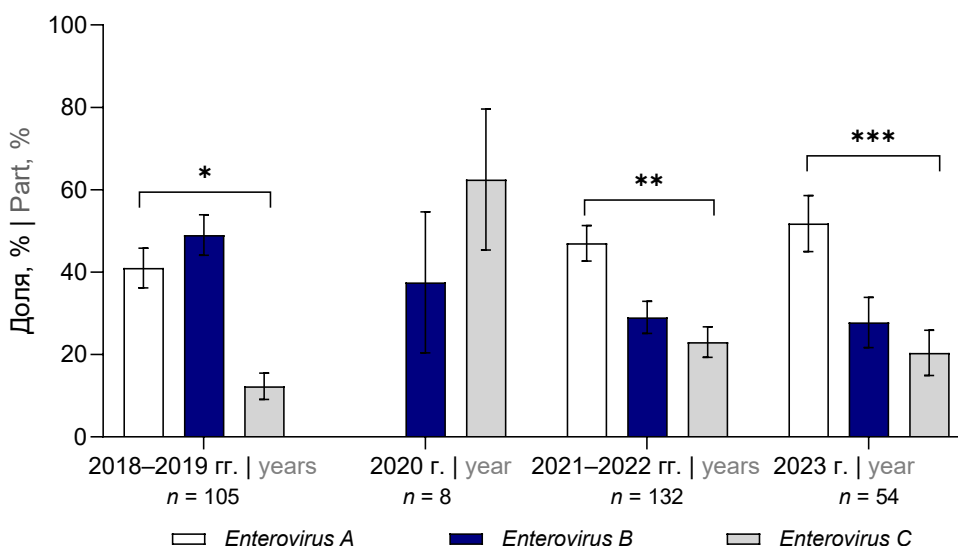


Рис. 5. Распределение видов НПЭВ, идентифицированных у детей с ОКИ в 2018–2023 гг.

* $p = 0,000001$; ** $p \leq 0,002142$; *** $p \leq 0,009897$.

Fig. 5. Species distribution of NPEV isolated from children with All in 2018–2023.

* $p = 0.000001$; ** $p \leq 0.002142$; *** $p \leq 0.009897$.

нем были обнаружены в 5,0% случаев. При этом до пандемии (2018–2019 гг.) частота обнаружения ЭВ составила 6,4%, что сопоставимо с данными за 2006–2011 гг., когда у детей, госпитализированных с ОКИ в тот же инфекционный стационар Нижнего Новгорода, НПЭВ были обнаружены в $7,6 \pm 0,3\%$ случаев [14]. По данным зарубежных авторов, ЭВ у детей с ОКИ до пандемии COVID-19 выявлялись в пределах 3,3–11,0% [20–22].

Проведённый анализ заболеваемости всеми формами ЭВИ в Нижегородской области и частоты обнаружения ЭВ у детей с диагнозом ОКИ показал, что в 2018–2022 гг. динамика частоты обнаружения ЭВ повторяла динамику заболеваемости ЭВИ, и в 2020 г. в обоих случаях наблюдался резкий спад изучаемых показателей. Заболеваемость ЭВИ детей в возрасте до 17 лет в Нижегородской области уменьшилась в 22,7 раза (по данным официальной статистики), частота обнаружения ЭВ — в 4,5 раза. В 2020 г. в связи с пандемией COVID-19 в Нижегородской области, как и в стране в целом, были введены противоэпидемические мероприятия (масочный режим, запрет на проведение массовых мероприятий, режим самоизоляции, карантин, повышение осведомлённости о гигиене, ограничения на перемещение), направленные на предотвращение распространения SARS-CoV-2, реализующего аспирационный механизм передачи. В это время заболеваемость ЭВИ детей в возрасте до 17 лет в Нижегородской области снизилась до 2,16 на 100 тыс., а частота обнаружения НПЭВ у детей с ОКИ достигла минимума (1,7%). Эти данные свидетельствуют об эффективном влиянии ограничительных противоэпидемических мероприятий на активность циркуляции ЭВ, способных реализовывать разные механизмы и пути передачи, и, соответственно, на заболеваемость ЭВИ.

В 2021–2022 гг. на фоне наметившегося роста заболеваемости всеми формами ЭВИ частота обнаружения ЭВ у детей с ОКИ увеличилась, составив в среднем 5,5% (4,1–7,8%). Постепенный рост частоты обнаружения соотносится с результатами исследования, проведённого в Республике Беларусь в 2020–2022 гг., где НПЭВ у детей с ОКИ в сумме были идентифицированы в 3% случаев, а ежегодная частота обнаружения также имела тенденцию к росту (1,1–3,7%) [23]. Однако после пандемии в 2023 г. на фоне роста заболеваемости всеми формами ЭВИ частота обнаружения ЭВ у детей с клиникой ОКИ достоверно снизилась в 2,1 раза (7,8–3,7%).

ЭВ выявлялись в образцах фекалий в ходе сезонного летне-осеннего подъёма заболеваемости ЭВИ во всех возрастных группах детей, госпитализированных с диагнозом ОКИ. Однако в разные годы изучаемого периода пиковые месяцы и доминирующая возрастная группа их обнаружения менялись. До пандемии наибольшие значения частоты

обнаружения ЭВ были зарегистрированы в мае и сентябре преимущественно в возрастной группе детей до 3 лет, в то время как после отмены «локдауна» — в июле, в возрастной группе 3–7 лет (организованные дети дошкольного возраста). Обращает на себя внимание отсутствие в 2023 г. случаев обнаружения ЭВ у детей с ОКИ в возрастной группе старше 7 лет, которая характеризуется высокой поражаемостью ЭВ, вызывающими неврологические формы инфекции (KB5, E6, E30) [24]. Снижение частоты обнаружения ЭВ у детей, госпитализированных с ОКИ в 2023 г., и отсутствие случаев их выявления в возрастной группе старше 7 лет может быть связано в том числе с появлением в общей ЭВ-популяции новых эпидемически значимых вариантов ЭВ, вызывающих специфические клинические формы ЭВИ.

За 2018–2023 гг. у детей с клиникой ОКИ нами был идентифицирован 41 тип НПЭВ. Спектр типов ЭВ включал широко распространённых возбудителей экзантемных форм инфекции и нейроинфекций (в 2018 г. — KB5, E9, E30, ЭВ-A71; в 2019 г. — KA6, KA4, ЭВ-A71, E6; в 2021 г. — KA6, KA9, E11; в 2022 г. — KA6, KA5, KA16, KA9, E11; в 2023 г. — KA6, KA10, E30), что отражает типовой состав нижегородской популяции ЭВ. Так, в Приволжском федеральном округе, в том числе в Нижегородской области, в допандемический период широко циркулировали вирусы E6, E30, KA6, ЭВ-A71 [25], в 2021 г. доминировал KA6, выявлялись KA10 и KA9⁷.

Кроме ЭВ, являющихся этиологической причиной различных клинически выраженных заболеваний, у детей с ОКИ были идентифицированы типы, встречающиеся, как правило, при «малой» или кишечной формах инфекции (KA3, E1, E2, E3, KA20, KA21, KA22, KA24, ЭВ-C116), и типы, редко выявляемые на территории России (ЭВ-A76, ЭВ-A90, ЭВ-C99). Идентификация в образцах фекалий детей с кишечной формой инфекции редко встречающихся типов НПЭВ дополнила характеристику типового состава нижегородской популяции ЭВ. На значимость обследования детей с ОКИ для выявления редких типов НПЭВ указывают и результаты исследования, проведённого в Мозамбике в 2014–2018 гг. [24].

Обнаруженные у детей с ОКИ ЭВ относились к 4 видам: *Enterovirus A* (44,5%), *Enterovirus B* (35,1%), *Enterovirus C* (20,1%), *Enterovirus D* (0,3%). При этом до пандемии COVID-19 идентифицированы 27 типов, во время пандемии в 2020 г. — 5, после отмены ограничительных мероприятий в период пандемии — 24, после пандемии — 20. Число типов НПЭВ, обнаруживаемых у детей с диарей-

⁷ Информационный электронный бюллетень. 2022. № 9. С. 3–16. URL: <https://nniiem.ru/file/publicat/2022/nniiem-inf-bulleten-evi-za-2021-n9.pdf> (дата обращения: 27.02.2024).

ными заболеваниями в разные периоды времени на разных территориях, может значительно отличаться. В нашем предыдущем исследовании при типировании ЭВ, выявленных у детей с ОКИ в 2006–2011 гг., были идентифицированы 22 типа НПЭВ видов *Enterovirus A* (38,6%), *Enterovirus B* (38,6%), *Enterovirus C* (20,8%) [14]. По данным зарубежных авторов, у детей, обследованных по случаю ОКИ, чаще выявлялись НПЭВ видов *Enterovirus B* и *Enterovirus C*. Так, в Индии при обследовании 305 детей с ОКИ в 2011–2012 гг. было идентифицировано 23 типа ЭВ, преимущественно вида *Enterovirus B* (73,68%; 28/38) [27]. В Северной Бразилии в 2010–2011 гг. при обследовании 175 детей с симптомами острого гастроэнтерита выявлены 19 типов ЭВ, при этом 11 типов (61,1%; 22/36) принадлежали виду *Enterovirus B* [28]. Напротив, в Северной Америке в 2012 г. у детей с ОКИ идентифицировано всего 8 типов НПЭВ видов *Enterovirus A* и *Enterovirus B*, при этом *Enterovirus C* не были обнаружены [21].

Анализ относительного видового распределения НПЭВ, идентифицированных у детей с ОКИ в 2018–2023 гг., показал, что соотношение видов ЭВ менялось со временем. Так, до пандемии COVID-19 преимущественно идентифицировались ЭВ видов *Enterovirus A* и *Enterovirus B*, приблизительно в равном соотношении. Во время пандемии (2020 г.), в период действия жестких ограничительных противоэпидемических мероприятий, в основном выявлялись ЭВ вида *Enterovirus C* (доминировал Коксаки А1), в единичных случаях *Enterovirus B* и не был идентифицирован ни один из типов вида *Enterovirus A*. Последние возобновили свою циркуляцию после смягчения ограничительных мер и окончания пандемии и заняли доминирующее положение в спектре выявляемых вирусов. Значительное снижение заболеваемости экзантемой полости рта и конечностей и герпангиной, главными возбудителями которых являются ЭВ-А71 и КА16, во время пандемии отмечено в исследованиях, проведенных в Китае [29, 30], что, по мнению авторов, указывает на предотвращение передачи ЭВ аспирационным и контактным механизмами вследствие применения противоэпидемических мер. В нашем исследовании показаны различия в эффективности влияния ограничительных мероприятий, направленных на блокировку воздушно-капельного пути передачи SARS-CoV-2, на частоту обнаружения у детей с ОКИ ЭВ разных видов, что, по всей вероятности, является следствием реализации ими различных механизмов передачи.

Заключение

Данные 6-летнего мониторинга НПЭВ у детей с ОКИ демонстрируют их генетическое разнообразие, представленное как минимум 41 типом вирусов видов *Enterovirus A–D*. Спектр типов включает ос-

новных возбудителей серозного менингита, экзантемы полости рта и конечностей, герпангины, экзантемы, миокардита и редкие типы, встречающиеся при «малой» или кишечной формах инфекции, что дополняет характеристику территориальной ЭВ-популяции.

Результаты исследования демонстрируют выраженный эффект влияния комплекса противоэпидемических мероприятий, проводимых в период пандемии COVID-19, на заболеваемость ЭВИ и активность циркуляции НПЭВ разных видов. У детей с ОКИ в условиях блокировки аспирационного механизма передачи SARS-CoV-2 наблюдалось снижение частоты обнаружения в фекалиях вирусов вида *Enterovirus B*, отсутствие выявления *Enterovirus A* и постоянное присутствие *Enterovirus C*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Tapparel C., Siegrist F., Petty T.J., Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* 2013;14:282–93.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
2. Posnakoglou L., Tatsi E.B., Chatzichristou P., et al. Molecular epidemiology of enterovirus in children with central nervous system infections. *Viruses.* 2021;13(1):100.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v13010100>
3. Anis H., Shaik A.B., Tiwari A., et al. Outbreak of severe myocarditis in England: Havoc by a harmless virus. *Health Sci. Rep.* 2023;6(9):e1541.
DOI: <https://doi.org/10.1002/hsr2.1541>
4. Grapin M., Mirand A., Pinquier D., et al. Severe and fatal neonatal infections linked to a new variant of echovirus 11, France, July 2022 to April 2023. *Euro Surveill.* 2023;28(22):2300253. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2023.28.22.2300253>
5. Brown D.M., Zang Y., Scheuermann R.H. Epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio enteroviruses. *Microorganisms.* 2020;8(12):1856.
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121856>
6. Messacar K., Asturias E.J., Hixon A.M., et al. Enterovirus D68 and acute flaccid myelitis-evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect. Dis.* 2018;18(8):e239–47.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30094-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30094-X)
7. Dyda A., Stelzer-Braid S., Adam D., et al. The association between acute flaccid myelitis (AFM) and Enterovirus D68 (EV-D68) — what is the evidence for causation? *Euro Surveill.* 2018;23(3):17–00310.
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.3.17-00310>
8. Chang P.C., Chen S.C., Chen K.T. The current status of the disease caused by enterovirus 71 infections: epidemiology, pathogenesis, molecular epidemiology, and vaccine development. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2016;13(9):890.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph13090890>
9. Maruo Y., Nakanishi M., Suzuki Y., et al. Outbreak of aseptic meningitis caused by echovirus 30 in Kushiro, Japan in 2017. *J. Clin. Virol.* 2019;116:34–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.001>
10. Голицына Л.Н., Новикова Н.А. Энтеровирусы в Российской Федерации в 2013 г. В кн.: *Информационный электронный бюллетень «Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции».* Информационный бюллетень № 1. Нижний Новгород; 2014:12–5. Golitsyna L.N., Novikova N.A. Enteroviruses in the Russian Federation in 2013. In: *Electronic Newsletter «Morbidity, Etiological Structure and Issues of Prevention of*

- Enterovirus (Non-Polio) Infection*. Newsletter No. 1. Nizhniy Novgorod;2014:12–5. EDN: <https://elibrary.ru/xvuovf>
11. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Селиванова С.Г. и др. Этиологическая структура энтеровирусных инфекций в Российской Федерации в 2017–2018 гг. *Здоровье населения и среда обитания* — *ЗНУСО*. 2019;(8):30–8. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Selivanova S.G., et al. Etiological structure of enterovirus infections in the Russian Federation in 2017–2018. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2019;(8):30–8. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38> EDN: <https://elibrary.ru/rszldb>
 12. Harvala H., Broberg E., Benschop K., et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. Clin. Virol.* 2018;101:11–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.008>
 13. Фомина С.Г., Новикова Н.А. Мониторинг циркуляции энтеровирусов среди детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде в 2006–2010 гг. *Медицинский альманах*. 2011;(4):28–9. Fomina S.G., Novikova N.A. The monitoring of circulation of enteroviruses among children with acute intestinal infection in Nizhny Novgorod in 2006–2010. *Medical Almanac*. 2011;(4):28–9. EDN: <https://elibrary.ru/nujksj>
 14. Фомина С.Г., Новикова Н.А. Энтеровирусы у детей с острой кишечной инфекцией: молекулярно-эпидемиологические аспекты. *Инфекционные болезни*. 2012;10(4):12–8. Fomina S.G., Novikova N.A. Enteroviruses in children with acute enteric infection: molecular-epidemiological aspects. *Infectious Diseases*. 2012;10(4):12–8. EDN: <https://elibrary.ru/pusfav>
 15. Knudsen P.K., Lind A., Klundby I., Dudman S. The incidence of infectious diseases and viruses other than SARS-CoV-2 amongst hospitalised children in Oslo, Norway during the COVID-19 pandemic 2020–2021. *J. Clin. Virol. Plus*. 2022;2(1):100060. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcvp.2021.100060>
 16. Fukuda Y., Tsugawa T., Nagaoka Y., et al. Surveillance in hospitalized children with infectious diseases in Japan: Pre- and post-coronavirus disease 2019. *J. Infect. Chemother.* 2021;27(11):1639–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.07.024>
 17. Grochowska M., Ambrozej D., Wachnik A., et al. The impact of the COVID-19 pandemic lockdown on pediatric infections – a single-center retrospective study. *Microorganisms*. 2022;10(1):178. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010178>
 18. Михайлова Ю.М., Черепанова Е.А. Энтеровирусная (неполио) инфекция в Российской Федерации в 2022 г. В кн.: *Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции. Информационный бюллетень №10*. Нижний Новгород;2023:3–5. Mikhailova Yu.M., Cherepanova E.A. Enterovirus (non-polio) infection in the Russian Federation in 2022. In: *Morbidity, etiological structure and issues of prevention of enterovirus (non-polio) infection. Newsletter No. 10. Nizhniy Novgorod;2023:3–5*. EDN: <https://elibrary.ru/iiyode>
 19. МР 4.2.0327-23. Молекулярное типирование энтеровирусов. М.;2023. MR 4.2.0327-23. Molecular typing of enteroviruses. Moscow;2023.
 20. Pérez-Martínez Z., Álvarez-Argüelles M.E., Rojo-Alba S., et al. Incidence of enterovirus in patients with acute gastroenteritis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2021;40(10):2185–90. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04275-6>
 21. Hassan F., Kanwar N., Harrison C.J., et al. Viral etiology of acute gastroenteritis in < 2-year-old US children in the post-rotavirus vaccine era. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2019;8(5):414–21. DOI: <https://doi.org/10.1093/jpids/piy077>
 22. Biscaro V., Piccinelli G., Gargiulo F., et al. Detection and molecular characterization of enteric viruses in children with acute gastroenteritis in Northern Italy. *Infect. Genet. Evol.* 2018;60:35–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.011>
 23. Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В., Колтунова Ю.Б. и др. Типовое разнообразие возбудителей вирусных острых кишечных инфекций в Республике Беларусь. В кн.: *Сборник трудов XV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»*. М.;2023:177–8. Poklonskaya N.V., Amvros'eva T.V., Koltunova Yu.B., et al. Typical diversity of pathogens of viral acute intestinal infections in the Republic of Belarus. In: *Proceedings of the XV Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases named after Academician V.I. Pokrovsky «Infectious Diseases in the Modern World: Evolution, Current and Future Threats»*. Moscow;2023:177–8. EDN: <https://elibrary.ru/vjtual>
 24. Бегайдарова Р.Х., Девдариани Х.Г., Байгутанова Г.Ж. и др. Клинико-лабораторные особенности энтеровирусных менингитов, обусловленных echo-30, у детей разных возрастных групп. *Медицина и экология*. 2015;(2):47–54. Begaidarova R.Kh., Devdariani Kh.G., Baigutanova G.Zh., et al. Clinical and laboratory features of enteroviral meningitis, caused by echo-30, in children of different age groups. *Medicine and Ecology*. 2015;(2):47–54.
 25. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Пономарева Н.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по энтеровирусной инфекции в РФ в 2019 году: заболеваемость, результаты лабораторной диагностики, прогноз на 2020 г. В кн.: *Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции. Информационный бюллетень № 7*. Нижний Новгород;2020:5–15. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Ponomareva N.V., et al. The epidemiological situation of enterovirus infection in the Russian Federation in 2019: morbidity, laboratory diagnostic results, forecast for 2020. In: *Morbidity, Etiological Structure and Issues of Prevention of Enterovirus (Non-Polio) Infection. Newsletter No. 7. Nizhniy Novgorod;2020:5–15*. EDN: <https://elibrary.ru/jkffyi>
 26. Bero D.M., da Silva E.E., de Sousa Júnior I.P., et al. Enterovirus detection in stool samples from Mozambican children with acute gastroenteritis. *Acta Trop.* 2023;238:106755. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106755>
 27. Gopalkrishna V., Ganorkar N., Patil P., et al. Clinical, epidemiological, and molecular aspects of picornaviruses (Enterovirus, Parecho) in acute gastroenteritis: A study from Pune (Maharashtra), Western India. *J. Med. Virol.* 2021;93(6):3590–600. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.26571>
 28. Machado R.S., Ivanildo P. De Sousa Jr., Jacqueline C.M., et al. Detection and identification of enteroviruses circulating in children with acute gastroenteritis in Pará State, Northern Brazil (2010–2011). *Virology J.* 2020;17:156. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01431-w>
 29. Li R., Wang M., Li D., et al. The impact of the COVID-19 pandemic on the number of hand, foot, and mouth disease due to enterovirus 71 infections. *J. Infect.* 2023;86(4):e111–e113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.02.005>
 30. Sun Y., Zhou J., Nie W., et al. Study on the epidemiological characteristics of enterovirus among pediatric patients in Hangzhou, China: A comparison between the pre-COVID-19, COVID-19 pandemic, and post-COVID-19 periods. *J. Med. Virol.* 2024;96(1):e29412. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.29412>

Информация об авторах

Селиванова Светлана Григорьевна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, svetafor22@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6610-1774>

Зверев Владимир Владимирович — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3853-9293>

Пономарева Наталья Вячеславовна — к.б.н., н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8950-6259>

Леонов Артем Викторович — м.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5486-3264>

Кашников Александр Юрьевич — н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1033-7347>

Епифанова Наталья Владимировна — к.б.н., в.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

Полянина Анастасия Викторовна — к.м.н., зав. лаб. эпидемиологии вирусных гепатитов, зам. директора по научной работе ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1258-5467>

Новикова Надежда Алексеевна — д.б.н., профессор, зав. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Участие авторов: *Селиванова С.Г.* — дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ литературы и экспериментальных данных, визуализация, написание и оформление рукописи; *Зверев В.В., Пономарева Н.В., Леонов А.В., Кашников А.Ю.* — проведение экспериментов; *Епифанова Н.В.* — анализ экспериментальных данных, редактирование рукописи; *Полянина А.В.* — редактирование рукописи; *Новикова Н.А.* — концепция и дизайн исследования, руководство. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 19.03.2024;
принята к публикации 22.05.2024;
опубликована 20.06.2024

Information about the authors

Svetlana G. Selivanova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, svetafor22@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6610-1774>

Vladimir V. Zverev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3853-9293>

Natalya V. Ponomareva — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8950-6259>

Artem V. Leonov — junior researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5486-3264>

Alexander Yu. Kashnikov — researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1033-7347>

Natalia V. Epifanova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

Anastasia V. Polyagina — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of epidemiology of viral hepatitis, Deputy Director for scientific work, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1258-5467>

Nadezhda A. Novikova — D. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of molecular epidemiology of viral infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Author contribution: *Selivanova S.G.* — study design, research, analysis of literature and experimental data, visualization, writing and design of the text; *Zverev V.V., Ponomareva N.V., Leonov A.V., Kashnikov A.Yu.* — research; *Epifanova N.V.* — analysis of experimental data, editing of the text; *Polyagina A.V.* — editing the text; *Novikova N.A.* — study concept and design, management. 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 19.03.2024;
accepted for publication 22.05.2024;
published 29.06.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-487>



Разработка методики молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis* с использованием новых VNTR- и INDEL-маркеров

Печковский Г.А.^{1✉}, Еременко Е.И.¹, Рязанова А.Г.¹, Писаренко С.В.¹, Шапаков Н.А.¹, Аксенова Л.Ю.¹, Семенова О.В.¹, Тимченко Л.Д.², Куличенко А.Н.¹

¹Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

²Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. *Bacillus anthracis* — возбудитель особо опасного зооноза сибирской язвы — отличается высокой генетической однородностью, что вызывает необходимость совершенствования методов генотипирования.

Целями исследования были поиск, описание VNTR- и INDEL-локусов *B. anthracis* и разработка на их основе методики генотипирования посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией результатов.

Материалы и методы. Поиск VNTR- и INDEL-маркеров и филогенетический анализ выполняли на выборке из 388 геномов штаммов *B. anthracis*: 322 из GenBank (RefSeq) и 66 — из коллекции Ставропольского противочумного института. Филогенетический анализ проводили на основе SNP корового выравнивания с помощью программы «Parsnp». Поиск маркеров осуществляли с использованием программы «Mauve» и авторских скриптов на языке Python. ПЦР выполняли с помощью набора «ScreenMix-HS».

Результаты. Найдены геномные вариации штаммов *B. anthracis* (SNP — 25 664, SNR — 14 387, VNTR — 693, INDEL — 14 667), биоинформатический анализ которых позволил выявить 9 новых VNTR и 6 INDEL молекулярных маркеров, наиболее подходящих для генотипирования. Описаны генетические (аллельные) варианты маркеров. Для найденных маркеров подобраны праймеры и разработан протокол ПЦР с детекцией методом электрофореза в агарозном геле. В результате кластеризации при типировании с использованием VNTR-маркеров штаммы разделялись на 9 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.005/006, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.008/009 (штамм 228/269), B.Br.001/002. При типировании с применением INDEL-маркеров штаммы разделялись на 6 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.001/002 (B.Br.014), а также кластер, включающий представителей нескольких генетических групп: A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 и B.Br.001/002.

Заключение. Использование разработанной методики идентификации переменных VNTR- и INDEL-локусов позволяет достоверно определять филогенетическое положение штаммов *B. anthracis* и перспективно для применения в процессе эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы.

Ключевые слова: генотипирование, VNTR, INDEL *Bacillus anthracis*, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ

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: Печковский Г.А., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Шапаков Н.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Тимченко Л.Д., Куличенко А.Н. Разработка методики молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis* с использованием новых VNTR- и INDEL-маркеров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):362–371.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-487>

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

Development of a technique for molecular typing of *Bacillus anthracis* strains using new VNTR and INDEL markers

Grigorii A. Pechkovskii¹✉, Evgeny I. Eremenko¹, Alla G. Ryazanova¹,
Sergey V. Pisarenko¹, Nikolay A. Shapakov¹, Lyudmila Yu. Aksenova¹,
Olga V. Semenova¹, Lyudmila D. Timchenko², Alexander N. Kulichenko¹

¹Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia;

²North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. *Bacillus anthracis*, the pathogen of a particularly dangerous zoonotic disease known as anthrax, requires strict epidemiological control and is characterized by high genetic homogeneity, which necessitates the development of genotyping methods.

The aim of the study were to find and characterize the VNTR and INDEL loci of *B. anthracis* and to develop on their basis a genotyping technique by PCR with electrophoretic detection of the results.

Materials and methods. Marker search and phylogenetic analysis were performed on a sample of 388 genomes of *B. anthracis* strains, 322 from the GenBank collection (RefSeq) and 66 from the collection of the Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor. Phylogenetic analysis was performed on the basis of SNP crustal alignment using the Parsnp program. The search for markers was carried out using the Mauve program and author's scripts in Python. PCR was performed using a ScreenMix-HS kit (CJSC "Eurogen", Russia).

Results. Genomic variations of *B. anthracis* strains (SNP — 25,664, SNR — 14,387, VNTR — 693, INDEL — 14,667) were found, bioinformatic analysis of which revealed nine new VNTR and six INDEL molecular markers most suitable for genotyping. The genetic (allelic) variants of the markers are described. Primers were selected for the found markers and a PCR protocol with detection by electrophoresis in agarose gel was developed. When typing using VNTR markers was applied, the strains were divided into nine clusters: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.005/006, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.008/009 (strain 228/269), B.Br.001/002. When typing using INDEL markers, the strains were divided into six clusters: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.001/002 (B.Br.014), as well as a cluster comprising several genetic lineages: A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 и B.Br.001/002.

Conclusion. The use of the developed methodology for the identification of variable VNTR and INDEL loci makes it possible to reliably determine the phylogenetic position of *B. anthracis* strains and is promising for use in the epidemiological investigation of anthrax outbreaks.

Keywords: genotyping, VNTR, INDEL, *Bacillus anthracis*, whole genome sequencing, phylogenetic analysis

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: Pechkovskii G.A., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Shapakov N.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Timchenko L.D., Kulichenko A.N. Development of a technique for molecular typing of *Bacillus anthracis* strains using new VNTR and INDEL markers *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):362–371.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-487>

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

Введение

Bacillus anthracis — спорообразующая грамположительная палочка, возбудитель сибирской язвы, особо опасной инфекции с глобальным ареалом распространения. В ранних исследованиях попытки определить генетическую вариабельность *B. anthracis* не увенчались успехом, что говорило о высокой генетической мономорфности этого вида [1]. Первым генетическим маркером, пригодным для дифференциации штаммов *B. anthracis*, были тандемные повторы в хромосомном локусе *vrrA* —

последовательно повторяющиеся идентичные фрагменты ДНК (variable number tandem repeats, VNTR) [2]. Аллельные варианты *vrrA* с числом повторов от 2 до 6 позволяли разделить все штаммы на 5 групп [2, 3]. Маркер вошёл в первую схему типирования методом мультилокусного VNTR-анализа MLVA8 (Multiple loci VNTR analysis, MLVA), состоящую из 6 хромосомных и 2 плазмидных VNTR-локусов. VNTR-локусы в целом отличаются от других вариабельных областей тем, что имеют бóльшую частоту изменчивости и большее количество вари-

антов, а также проявлением эффекта гомоплазии, т.е. независимыми или параллельными мутациями у разных генетических линий [4]. Поэтому при генотипировании на основе анализа VNTR-локусов затруднительно изучение внутривидовой эволюции, но при этом данный метод удобен в эпидемиологическом расследовании вспышек сибирской язвы. Активные поиски локусов *B. anthracis* с тандемными повторами привели к открытию 32 VNTR-маркеров в 6 схемах MLVA-генотипирования [5–10].

С целью исследования генетического разнообразия был разработан и апробирован на значительной выборке штаммов метод генотипирования на основе анализа «канонических» SNP (canSNP-типирование) с определением 12 основных генетических линий [8]. Канонические линии наиболее точно отражают эволюционные группы *B. anthracis*, поэтому лучше всего подходят для описания распределения штаммов возбудителя сибирской язвы в мире. В дальнейшем были выполнены масштабные филогенетические исследования с подробным описанием, созданием номенклатуры названий и связей генетических кластеров. Подкластерам канонических линий были присвоены номера или тривиальные имена [11, 12]. В частности, каноническая линия A.Br.008/009 включает в себя подгруппы Tsiankovskii и STI, широко представленные на территории Содружества Независимых Государств.

В 2019 г. в Республике Дагестан произошла вспышка сибирской язвы с изолятами, которые кластеризовались в отдельную филогенетическую группу A.Br.125, принадлежащую STI.

Каноническая линия V.Br.001/002 содержит кластеры Siberia и Europe, составляя V.Br.014, а также кластеры Asia и V.Br.018.

С учётом устоявшихся и вновь идентифицированных обозначений генетических линий и групп в последующем описании мы использовали следующий порядок. Сначала указывается каноническая линия, затем новая подгруппа или кластер в её пределах с устоявшимся обозначением, если таковые идентифицированы. Например, большинство штаммов основной линии A, выделенных на территории России, обозначаются как относящиеся к A.Br.008/009 (Tsiankovskii) или A.Br.008/009 (STI).

К молекулярным маркерам также относятся INDEL (insertion/deletion) — варибельные области, не содержащие повторов, которые существуют преимущественно в виде двух генетических вариантов: с делецией или с инсерцией.

Для бактерии *Francisella tularensis* была разработана схема INDEL-типирования, включающая 38 INDEL-локусов. Исследование показало, что применение таких маркеров повышает точность типирования [13]. Методики генотипирования на основе анализа INDEL-локусов также созданы для *Helicobacter pylori*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio*

cholerae, *Yersinia pseudotuberculosis* и доказали свою высокую разрешающую способность и надёжность в определении филогенетического положения штаммов [14–17]. В настоящее время система INDEL-генотипирования для *B. anthracis* не разработана.

Целями исследования были поиск, описание VNTR- и INDEL-локусов *B. anthracis* и разработка на их основе методики генотипирования посредством ПЦР с электрофоретической детекцией результатов.

Материалы и методы

Поиск маркеров и филогенетический анализ выполняли на выборке из 388 геномов штаммов *B. anthracis*: 322 — из коллекции GenBank (RefSeq), 66 — из коллекции геномов патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института, описанных ранее [12]. Номера геномов приведены в Приложении 1 на сайте журнала (<https://doi.org/10.36233/0372-9311-487-s1>). Геномные последовательности штаммов *B. anthracis* из коллекции Ставропольского противочумного института депонированы в «Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов» (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии).

Поиск маркеров осуществляли посредством алгоритма (пайплайна), состоящего из попарного выравнивания полных геномов на референсную последовательность с использованием программы «Mauve» и далее, с помощью авторских скриптов на языке Python, извлечения из выравниваний генетических вариантов, объединения и их анализа.

Верификацию маркеров и определение длин маркеров производили в программе «BLASTn» с помощью фланкирующих последовательностей или определённых праймеров.

С целью сопоставления филогенетических групп с генетическими маркерами выполняли построения филогенетической дендрограммы на основе SNP корового выравнивания с помощью программы «Parsnp» из пакета «Harvest suite» с референсным геномом *B. anthracis* Ames Ancestor (GCF_000008445.1). Из коровых SNP удаляли позиции, имеющие неизвестный нуклеотид «N». Далее SNP из файла VCF конвертировали в файл FASTA. Филогенетическое дерево строили в программе «MEGA XI» методом максимального правдоподобия с моделью замен Tamura-Nei [18].

Сопоставление длин генетических вариантов маркеров с филогенетической дендрограммой и визуализацию данных осуществляли в среде языка R с библиотеками ggtree и ggplot2.

Конструирование праймеров осуществляли с использованием программы «Primer-BLAST», их синтез проводили в Ставропольском противочумном институте.

Пробоподготовку культур *B. anthracis* проводили согласно с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Экстракцию ДНК *B. anthracis* осуществляли с применением набора «ДНК-сорб-В» («ИЛС»).

Для верификации данных в ПЦР с электрофоретической детекцией использовали представительную филогенетическую выборку из секвенированных штаммов. ПЦР выполняли с помощью набора «ScreenMix-HS» («Евроген»). Количество праймеров в реакции равнялось 0,3 мкМ. Использовали следующий режим термоциклирования: первый этап (активация) — 95°C, 5 мин — 1 цикл, второй этап — денатурация 95°C, 20 с, отжиг 60°C, 20 с, элонгация 72°C, 60 с — 40 циклов, третий этап (финальная элонгация) — 72°C, 5 мин — 1 цикл. Электрофорез проводили в 2% агарозном геле с применением стандарта молекулярных размеров 100 п. н. («СибЭнзайм»).

Кластеризацию данных, полученных по результатам ПЦР с электрофоретической детекцией, выполняли методом single (Nearest Point Algorithm) на языке Python с библиотекой scipy.

Результаты и обсуждение

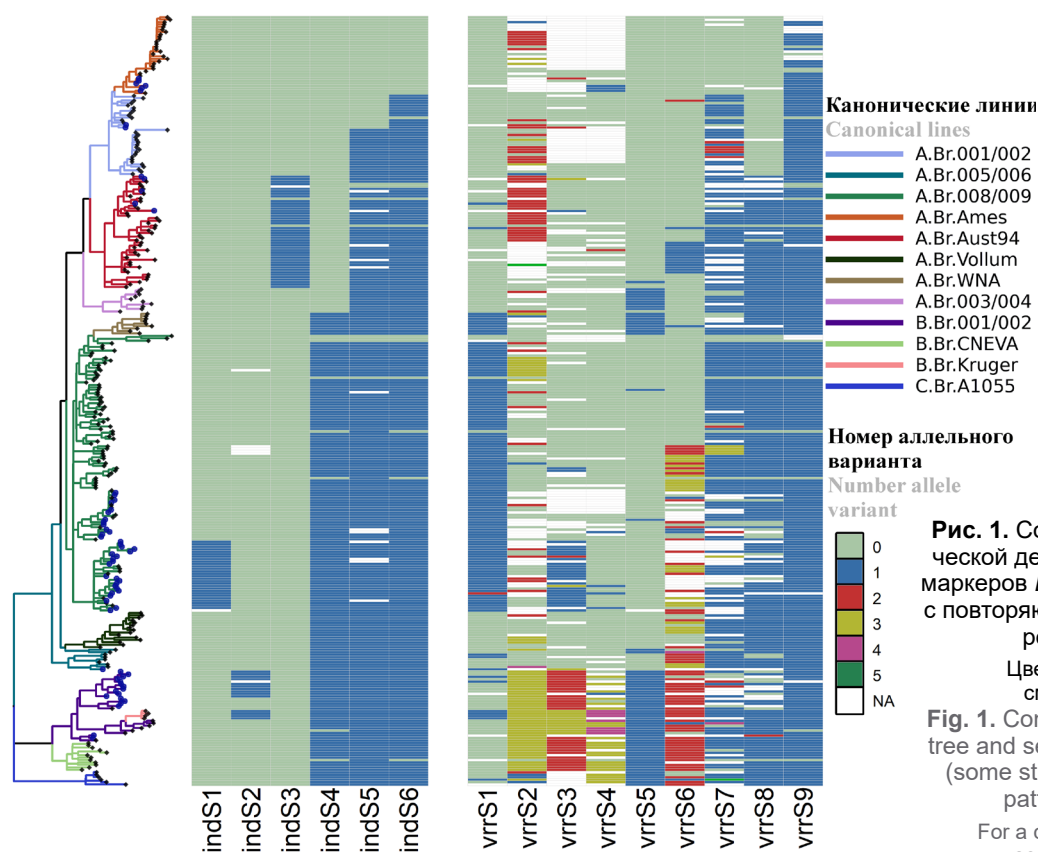
Исследование включало два этапа. На первом этапе выполняли поиск и описание маркерных локусов, на втором — осуществляли эксперименталь-

ное подтверждение и апробацию методики типирования с использованием найденных маркеров.

В результате работы алгоритма были обнаружены следующие геномные вариации: SNP — 25 664, SNR — 14 387, VNTR — 693, INDEL — 14 667.

Поиск маркеров среди всех найденных вариаций производили поэтапно с фильтрацией по ряду критериев. Разница размеров вариантов переменных локусов должна быть не менее 15 п. н. Отбирали преимущественно такие локусы, у которых хотя бы один генетический вариант в наборе штаммов *B. anthracis* из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института был отличен от вариантов остальных штаммов. Исключали уже описанные переменные локусы. С учётом критериев было найдено 537 переменных областей.

Вслед за этим исследовали частоту встречаемости аллельных вариантов локусов штаммов в определённых генетических линиях, для этого сопоставляли длины генетических вариантов маркеров с филогенетической дендрограммой, построенной на SNP корового генома (рис. 1). Большинство вариантов локусов встречались только у 1 штамма или минимального количества штаммов. Значительную группу составляли варианты, разделяющие основные генетические линии А, В, и С, в том числе ранее найденный INDEL indE1 размером 38 п. н. [19], что логично, т. к. это наиболее эволюционно далёкие генетические линии.



Было отобрано 56 VNTR- и INDEL-локусов (табл. 1). Из них выбирали наиболее филогенетически значимые и оптимальные для проведения электрофореза. Таким образом, в итоге было выбрано 9 VNTR-маркеров и 6 INDEL-маркеров, наиболее подходящих для генотипирования (рис. 1). Особенность найденных INDEL заключается в повторях, фланкирующих INDEL, при этом один из повторов включается в делецию, а другой — нет. По этой причине можно предположить образование сложной структуры между цепями ДНК при репликации, из-за которой полимеразный комплекс может ошибочно удваивать цепь ДНК, вырезая часть последовательности. При этом невозможна обратная вставка INDEL, что, вероятно, уменьшает эффекты гомоплазии.

Инделлы indS1 (ген *FAD-binding oxidoreductase*), indS2 (ген гипотетического протеина *WP_000829051.1*) и indS6 (ген *cell surface protein*), локализованные в кодирующих белки генах, являются геномными вариациями без сдвига рамки считывания. Индел indS4 локализуется в регионе между генами *GBAA_RS02140* (ABC transporter ATP-binding protein) и *GBAA_RS02145* (ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein). IndS5 локализуется в регионе между генами *GBAA_RS03470* (hypothetical protein) и *GBAA_RS03475*

(alanine:cation symporter family protein). Индел indS3 сдвигает рамку считывания гена, кодирующего белок SPFH/Band 7/PHB domain protein.

Генетический вариант индела indS1 с делецией характерен для кластера A.Br.008/009 (Tsiankovskii). Индел indS2 необычен тем, что существуют 3 генетических варианта данного локуса: инсерция и 2 варианта делеций. Разницей между двумя делециями является сдвиг в 9 пар нуклеотидов. Один вариант характерен для подгрупп Siberia и Europe canSNP группы V.Br.001/002, другой характерен для штаммов группы V.Br.Kruger. Вариант локуса indS3 с делецией встречается у штаммов группы A.Br.Aust94, за исключением штамма 9080-G, выделенного в Грузии, и штамма Kanchipuram из Индии. Варианты инделов с делецией indS4, indS5, indS6 встречаются у кластеров A.Br.004, A.Br.001 и группы A.Br.Ames соответственно.

Количество аллельных вариантов выбранных VNTR-маркеров варьируют от 2 до 6 с длиной повтора от 30 п. н. до 196 п. н. (рис. 1). Локус *vrrS1* имеет вариант 425 п. н., встречающийся у A.Br.008/009 и A.Br.WNA, а также один уникальный вариант длиной 337 п. н., специфичный для штамма 228/269. Генетические варианты локуса *vrrS2* встречаются у групп A.Br.008/009 и A.Br.Aust94. Два VNTR-маркера — *vrrS3* и *vrrS4* —

Таблица 1. Описание найденных молекулярных маркеров *B. anthracis*

Table 1. Description of the identified molecular *B. anthracis* markers

Маркер Marker	Координаты локуса в геноме по референсному штамму Ames Ancestor (GCF_000008445.1) Coordinates of the locus in the genome according to the Ames Ancestor reference strain (GCF_000008445.1)	Репликон Replicon	Номер аллельного варианта (длина генетического варианта, п. н.) The number of the allele variant (the length of the genetic variant, bp)
indS1	1276500–1276764	Хромосома Chromosome	1 (265, 266), 2 (241)
indS2	1904893–1905267	Хромосома Chromosome	1 (373–375), 2 (312)
indS3	1944246–1944531	Хромосома Chromosome	1 (286), 2 (253)
indS4	402388–402715	Хромосома Chromosome	1 (328), 2 (423–424)
indS5	655408–655662	Хромосома Chromosome	1 (255), 2 (272, 284–285)
indS6	4691499–4691775	Хромосома Chromosome	1 (277), 2 (388–389)
<i>vrrS1</i>	1721221–1721733	Хромосома Chromosome	1 (513), 2 (425)
<i>vrrS2</i>	4489063–4489484	Хромосома Chromosome	1 (422), 2 (381), 3 (299,307), 4 (217), 5 (258) 6 (338–340)
<i>vrrS3</i>	8316–8860	pXO2	1 (544–546), 2 (301–302), 3 (464), 4 (383)
<i>vrrS4</i>	8916–9269	pXO2	1 (354–355), 2 (263–264), 3 (444), 4 (534), 5 (174)
<i>vrrS5</i>	3155556–3155727	Хромосома Chromosome	1 (172), 2 (142)
<i>vrrS6</i>	1092722–1092959	Хромосома Chromosome	1 (238), 2 (198), 3 (318–319), 4 (398), 5 (278)
<i>vrrS7</i>	5088417–5088723	Хромосома Chromosome	1 (306–307), 2 (190), 3 (229), 4 (385), 5 (346), 6 (268) (385)
<i>vrrS8</i>	5031546–5031803	Хромосома Chromosome	1 (258, 263–265), 2 (354, 359–366)
<i>vrrS9</i>	3742896–3743541	Хромосома Chromosome	1 (646), 2 (450)
indNS1	130607–131099	pXO1	1 (454, 456), 2 (494–495)
indNS2	596340–596832	Хромосома Chromosome	1 (352), 2 (492–493)

Окончание табл. 1 | End of the Table 1

Маркер Marker	Координаты локуса в геноме по референсному штамму Ames Ancestor (GCF_000008445.1) Coordinates of the locus in the genome according to the Ames Ancestor reference strain (GCF_000008445.1)	Репликон Replicon	Номер аллельного варианта (длина генетического варианта, п. н.) The number of the allele variant (the length of the genetic variant, bp)
indNS3	122138–122690	pXO1	1 (551–555), 2 (485, 487)
indNS4	77192–77540	pXO1	1 (330), 2 (349), 3 (619)
indNS5	482012–482157	Хромосома Chromosome	1 (146,149), 2 (504)
indNS6	385564–385837	Хромосома Chromosome	1 (271–276), 2 (305–308)
indNS7	1372136–1372298	Хромосома Chromosome	1 (163), 2 (181)
indNS8	2559203–2559485	Хромосома Chromosome	1 (282–284), 2 (335–336)
indNS9	3855034–3855252	Хромосома Chromosome	1 (219), 2 (231), 3 (239–241)
indNS10	4303573–4303825	Хромосома Chromosome	1 (253), 2 (310–311)
indNS11	4965875–4966088	Хромосома Chromosome	1 (214), 2 (321)
indNS12	1209302–1209701	Хромосома Chromosome	1 (253), 2 (399–401)
indNS13	2728738–2729257	Хромосома Chromosome	1 (229), 2 (519–520)
indNS14	486258–486638	Хромосома Chromosome	1 (285), 2 (381)
indNS15	1287411–1287701	Хромосома Chromosome	1 (201), 2 (291)
indNS16	910496–910796	Хромосома Chromosome	1 (301), 2 (490,491)
indNS17	2533966–2534193	Хромосома Chromosome	1 (228), 2 (634–636)
indNS18	2593388–2593616	Хромосома Chromosome	1 (228–230), 2 (283)
indNS19	3352013–3354229	Хромосома Chromosome	1 (193,194), 2 (2124), 3 (2207, 2215–2218, 2223)
indNS20	3829833–3830053	Хромосома Chromosome	1 (220–221), 2 (251)
indNS21	4811428–4811664	Хромосома Chromosome	1 (236–237), 2 (600, 602)
indNS22	29253–29436	pXO1	1 (184), 2 (269)
indNS24	1146673–1147101	Хромосома Chromosome	1 (256), 2 (270–272), 3 (427–430)
indNS25	2224848–2225376	Хромосома Chromosome	1 (270), 2 (418), 3 (529–530, 537)
indNS26	2687438–2687847	Хромосома Chromosome	1 (240–241), 2 (410,408–410), 3 (429) 4 (580)
indNS27	3304833–3305473	pXO1	1 (245, 257), 2 (640–641)
vrNS1	226241–226786	Хромосома Chromosome	1 (545–547), 2 (694, 697–699), 3 (845–847), 4 (997–998), 5 (1146), 6 (1296–1298)
vrNS2	1333990–1334961	Хромосома Chromosome	1 (343), 2 (554, 552), 3 (700), 4 (758, 762–763), 5 (779), 6 (971–974), 7 (1182–1183), 8 (1393)
vrNS3	2014690–2015095	Хромосома Chromosome	1 (277), 2 (364), 3 (406, 409), 4 (535)
vrNS4	4233686–4234066	Хромосома Chromosome	1 (237), 2 (273, 279), 3 (306, 309, 322), 4 (381), 5 (417), 6 (345)
vrNS5	4351696–4351908	Хромосома Chromosome	1 (213), 2 (231)
vrNS6	4598742–4598948	Хромосома Chromosome	1 (195, 207), 2 (171, 183)
vrNS7	811781–812154	Хромосома Chromosome	1 (284), 2 (302), 3 (320), 4 (374), 5 (428), 6 (482)
vrNS8	1395847–1396186	Хромосома Chromosome	1 (340), 2 (385)
vrNS9	1238148–1238579	Хромосома Chromosome	1 (361, 366), 2 (398), 3 (430–433), 4 (465), 5 (498)
vrNS10	2264930–2265251	Хромосома Chromosome	1 (244), 2 (283), 3 (322), 4 (361), 5 (439), 6 (517)
vrNS11	4352078–4352327	Хромосома Chromosome	1 (220), 2 (235), 3 (250, 251), 4 (264–266), 5 (295), 6 (310)
vrNS12	4927425–4927645	Хромосома Chromosome	1 (181), 2 (221)
vrNS13	4769700–4770199	Хромосома Chromosome	1 (499–501), 2 (352–353)
vrNS15	1151194–1151463	Хромосома Chromosome	1 (148), 2 (269–270), 3 (291), 4 (392–393, 396), 5 (514, 520)
vrNS16	2006677–2007157	Хромосома Chromosome	1 (481), 2 (433, 435–436), 3 (526), 4 (301), 5 (345–347), 6 (390–391), 7 (255–257)

были обнаружены на плазмиде pXO2. Отдельные генетические варианты *vrrS3* встречаются у A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.KrugerB и основной линии В соответственно. Локус *vrrS4* разделяет штаммы на линии А и В. Аллельный вариант 142 п. н. *vrrS5* встречается одновременно у штаммов линии В, групп A.Br.WNA и A.Br.003/004. Варианты *vrrS6* характерны для части штаммов группы A.Br.008/009, кластера A.Br.004 и линии В. Генетический вариант *vrrS7* 307 п. н. специфичен для группы A.Br.Ames. Вариант 258 п. н. *vrrS8* присущ группам A.Br.Ames и A.Br.001/002. Генетический вариант 646 п. н. *vrrS9* специфичен для штаммов A.Br.Ames, выделенных в Северной Америке.

Варибельные локусы могут быть сгруппированы по принадлежности к определённым генетическим кластерам. Так, схожей принадлежностью к группе A.Br.Aust94 обладают варианты инделов *indS3*, *indNS27* и VNTR — *vrrNS7*. Инделы *indS4* и *indNS11* характерны для A.Br.004, *indNS17* и *vrrS9* — для штаммов A.Br.Ames, выделенных в Северной Америке. Варианты инделов *indNS5*, *indNS9*, *indNS10* встречаются у штаммов групп A.Br.Ames и A.Br.001/002.

Для основной линии В характерными локусами являются *indNS1*, *indNS12*, *indNS19*, *indNS2*, *indNS3*, *indNS13*, *indNS14* и *vrrNS12*. Характерными локусами как для линии В, так и линии С являются *indNS18*, *indNS21*, *indNS4*, *indNS6*, *indNS7* и *indNS8*.

Часть из невыбранных маркеров также могли бы использоваться при типировании. Например, *vrrNS1* имеет высокую варибельность, но длинный повтор 150 п. н. и большую разницу по длине между минимальным и максимальным генетическим вари-

антом, что затруднительно для электрофоретической детекции при проведении ПЦР. VNTR *vrrNS15* вариабелен в пределах группы A.Br.008/009. Тандемные повторы *vrrNS16*, *vrrNS2*, *vrrNS4* не имеют строгой специфичности.

Для найденных маркеров были подобраны праймеры (табл. 2) и разработан протокол ПЦР с детекцией результатов методом электрофореза в агарозном геле (рис. 2, рис. 3). Отобранные маркеры имели длину нуклеотидной последовательности, достаточную для надёжного определения генетических вариантов локусов (табл. 3).

Часть штаммов не имеют плазмиды pXO2, соответственно локусы *vrrS3* и *vrrS4* у них также отсутствуют.

В результате кластеризации при INDEL-типировании штаммы разделялись на 6 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.001/002 (B.Br.014), а также кластер, включающий представителей нескольких генетических групп: A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 и B.Br.001/002. Кластер выделяется в отдельную группу, т. к. для штаммов этих линий не определены специфические INDEL-маркеры (рис. 4).

В результате кластеризация при VNTR-типировании штаммы разделялись на 9 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.005/006, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.008/009 (штамм 228/269), B.Br.001/002 (рис. 4). Штамм 228/269 входит в группу A.Br.008/009 (Tsiankovskii).

Дискриминирующая способность, определённая с использованием индекса разнообразия Hanter–

Таблица 2. Праймеры к VNTR- и INDEL-локусам *B. anthracis*
Table 2. Primers to VNTR and INDEL loci *B. anthracis*

Название Name	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse prime
<i>indS1</i>	TATTGGGCAGCAGCATTTGG	ATGAGTTGTACGGGACGCAA
<i>indS2</i>	TGGAGGGGTTGTCAAGCG	GCGTAACTCGGAGACCATGTA
<i>indS3</i>	AGCAACAGAAAAATGGGGCG	AATCGCTCTTGCTTCCCCTT
<i>indS4</i>	AGAAGGAACAAAAGGAAAAGTAGAG	CAACATGCTCGCCCTTCAAT
<i>indS5</i>	GGTCTATACGGCACACTCCA	GCTTCCAATATCCCCTCC
<i>indS6</i>	AGCCCCTTCTTCGGGTGAT	CGATGAAGATGAAGACAGCCC
<i>vrrS1</i>	TCGTCCTGGAGCATCTTCA	CCAAATCGCCCCTAGACCAA
<i>vrrS2</i>	GTTGTTTCATACGCTATCCCCTTC	GTCCTTTTGGACAGCCTCTCTT
<i>vrrS3</i>	ACTGTAGTTGTCCCTACCCCTT	AGAAGTACAGGTGGGACAGGA
<i>vrrS4</i>	TTTCCTTGGGATGCTTCACT	TGCTGGTATAGAGCCATCTGC
<i>vrrS5</i>	AGCAATGTTTAATCACCATCAAGT	GTACGCTTTAGTCGGAGACGG
<i>vrrS6</i>	AGGAAGCAGGTTAGCGTTGT	GCGCTATGTGGCGTCTTTTC
<i>vrrS7</i>	AGGAACACTGGTTCAGCCTAT	AGCAGGATCGCTTGCTAGAT
<i>vrrS8</i>	CTGCAATTGCCTTCGCCTTT	GCGAAAAAGAGAAAGCGCTAC
<i>vrrS9</i>	ATGAAGGTGTGACATGCCGT	GTGAAGCTGTAATTGTGGCGT

Gaston [20], для canSNP-типирования составила 0,7, а для типирования на основе анализа новых VNTR- и INDEL-маркеров — 0,79 и 0,84 соответственно.

Заключение

В результате анализа геномов 388 штаммов *B. anthracis* были найдены и охарактеризованы варибельные области. Найдены новые VNTR- и INDEL-маркеры и изучена их привязка к кластерам глобальной филогении. Разработанный протокол идентификации маркеров методом ПЦР с электрофоретической визуализацией результатов позволяет надёжно определять аллельные варианты маркеров. Найденные 9 VNTR-маркеров и 6 INDEL-маркеров позволяют разделить штаммы *B. anthracis* на 6 и 9 генетических групп при типировании с раздельным анализом этих маркеров и на 10 — при совместном. Методику генотипирования на основе анализа новых VNTR- и INDEL-маркеров рекомендуется использовать в совместном или раздельном варианте как дополнение к существующим схемам генотипирования. Использование разработанной методики идентификации варибельных VNTR- и INDEL-локусов позволяет достоверно определять филогенетическое положение штаммов *B. anthracis* и перспективна для применения в процессе эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Harrell L.J., Andersen G.L., Wilson K.H. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(7):1847–50. DOI: <https://doi.org/1128/jcm.33.7.1847-1850.1995>
- Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol.* 1996;178(2):377–84. DOI: <https://doi.org/1128/jb.178.2.377-384.1996>
- Jackson P.J., Walther E.A., Kalif A.S., et al. Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63(4):1400–5. DOI: <https://doi.org/1128/aem.63.4.1400-1405.1997>
- 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.* 2004;101(37):13536–41. DOI: <https://doi.org/1073/pnas.0403844101>
- Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000;182(10):2928–36. DOI: <https://doi.org/1128/jb.182.10.2928-2936.2000>
- Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001;1:2. DOI: <https://doi.org/1186/1471-2180-1-2>
- Lista F., Faggioni G., Valjevac S., et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol.* 2006;6:33. DOI: <https://doi.org/1186/1471-2180-6-33>
- 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/1371/journal.pone.0000461>

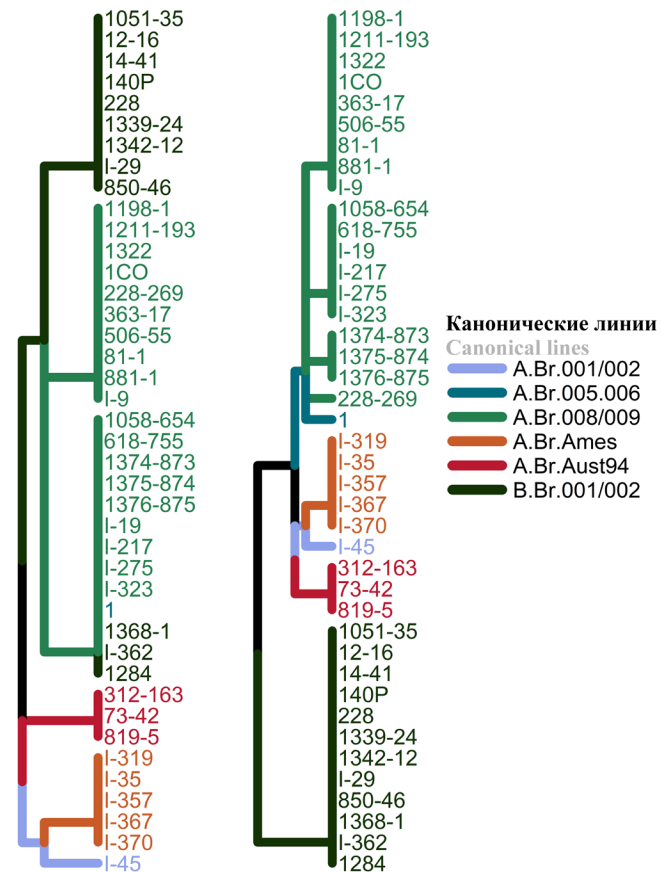


Рис. 4. Кластеризация штаммов *B. anthracis* при INDEL- и VNTR-типировании.

Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 4. Clustering of *B. anthracis* strains based on VNTR and INDEL typing.

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

- Beyer W., Bellan S., Eberle G., et al. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(3):e1534. DOI: <https://doi.org/1371/journal.pntd.0001534>
- Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., et al. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One.* 2014;9(6):e95131. DOI: <https://doi.org/1371/journal.pone.0095131>
- 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/1128/mBio.01501-16>
- 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/1016/j.meegid.2021.104890>
- Larsson P., Svensson K., Karlsson L., et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007;13(11):1725–32. DOI: <https://doi.org/3201/eid1311.070603>
- Сорокин В.М., Водопоьянов А.С., Писанов Р.В. INDEL-типирование — новый метод дифференциации штаммов *Helicobacter pylori*. *Бактериология.* 2020;5(1):8–13. Sorokin V.M., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V. INDEL-typing: a new method of differentiation of *Helicobacter pylori* strains. *Bacteriology.* 2020;5(1):8–13. DOI: <https://doi.org/20953/2500-1027-2020-1-8-13>

15. Леденева М.Л., Водопьянов А.С., Ткаченко Г.А. и др. Выявление INDEL-маркеров в геномах штаммов *Burkholderia pseudomallei* для внутривидового генотипирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;(4): 35–41. Ledeneva M.L., Vodopyanov A.S., Tkachenko G.A., et al. Detection of INDEL-markers in genomes of *Burkholderia pseudomallei* strains for intra-species genotyping. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;(4): 35–41. DOI: <https://doi.org/36233/0372-9311-2017-4-35-41> EDN: <https://elibrary.ru/bucgfm>
16. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017;22(4):195–200. Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Oleinikov I.P., Mishan'kin B.N. Indel-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2017;22(4):195–200. DOI: <https://doi.org/18821/1560-9529-2017-22-4-195-200> EDN: <https://elibrary.ru/zhlhhd>
17. Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А. и др. INDEL-типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(4):102–9. Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., et al. INDEL-typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. DOI: <https://doi.org/21055/0370-1069-2022-4-102-109> EDN: <https://elibrary.ru/rucepz>
18. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7):3022–7. DOI: <https://doi.org/1093/molbev/msab120>
19. 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/21055/0370-1069-2019-3-43-50> EDN: <https://elibrary.ru/pgefkd>
20. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(11):2465–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>

Информация об авторах

Печковский Григорий Александрович[✉] — м.н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, grigorii.pechkovskii@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Еременко Евгений Иванович — д.м.н., проф., г.н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8163-1300>

Рязанова Алла Геннадьевна — к.м.н., зав. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Писаренко Сергей Владимирович — к.х.н., в.н.с., лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Шапаков Николай Андреевич — м.н.с., лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

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>

Тимченко Людмила Дмитриевна — д.вет.н., проф., г.н.с. межфакультетской научно-образовательной лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии Северо-Кавказского федерального университета, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2011-880X>

Куличенко Александр Николаевич — д.м.н., проф., академик РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Участие авторов. Печковский Г.А. — концепция исследования, лабораторные исследования, биоинформационный анализ, написание статьи; Еременко Е.И. — геномные исследования, филогенетический анализ, написание статьи; Рязанова А.Г. — филогенетический анализ, написание статьи; Писаренко С.В. — геномные исследования, редактирование статьи; Шапаков Н.А. — геномные исследования, синтез праймеров; Аксенова Л.Ю., Семенова О.В. — лабораторные исследования; Тимченко Л.Д., Куличенко А.Н. — концепция исследования, редактирование статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 15.02.2024;
принята к публикации 25.04.2024;
опубликована 29.06.2024

Information about the authors

Grigori A. Pechkovskii[✉] — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, grigorii.pechkovskii@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Evgeny I. Eremenko — D. Sci. (Med.), Professor, principal researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8163-1300>

Alla G. Ryazanova — Cand. Sci. (Med.), Head, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

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>

Nikolay A. Shapakov — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Lyudmila Yu. Aksenova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Olga V. Semenova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Lyudmila D. Timchenko — D. Sci. (Vet.), Professor, principal researcher, Interdepartmental scientific and educational laboratory of experimental immunomorphology, immunopathology and immunobiotechnology, North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2011-880X>

Alexander N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Author contribution. Pechkovskii G.A. — research concept, laboratory research, bioinformatic analysis, writing an article; Eremenko E.I. — genomic research, phylogenetic analysis, writing an article; Ryazanova A.G. — phylogenetic analysis, writing an article; Pisarenko S.V. — genomic research, editing an article; Shapakov N.A. — genomic research, synthesis of primers; Aksenova L.Yu., Semenova O.V. — laboratory research; Timchenko L.D., Kulichenko A.N. — research concept, article 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 15.02.2024;
accepted for publication 25.04.2024;
published 29.06.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>



Влияние *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом на мембрану эритроцитов в крови морских свинок

Клюева С.Н.[✉], Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Эритроциты участвуют в развитии и реализации вакцинального и инфекционного процессов при чуме. Изменения их поверхностной архитектуры могут стать информативными критериями для доклинической оценки противочумных вакцин.

Цель работы — методом атомно-силовой микроскопии охарактеризовать состояние мембраны эритроцитов крови морских свинок в ответ на подкожное введение вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных.

Материалы и методы. Для иммунизации животных использовали *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенные производные *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pestis* KM217 (pYT⁻, pYV⁺, pYP⁻), *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻). Анализ мембраны эритроцитов проводили на сканирующем зондовом микроскопе «Solver P47-PRO» («НТ-MDT»).

Результаты. Наиболее выраженные изменения поверхностной архитектоники мембраны эритроцитов морских свинок установлены в течение первых 3 сут формирования иммунного ответа в отношении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенного варианта *Y. pestis* KM217, в геноме которого сохранена плаزمида pYV, взятых в дозе 5×10^8 КОЕ. Регистрировали значимое ($p < 0,05$) повышение доли трансформированных форм клеток ($43,67 \pm 3,63$ и $37,83 \pm 7,03\%$ против $4,08 \pm 0,86\%$ в контроле), среднеквадратичной шероховатости (319 ± 8 и 312 ± 7 нм против 70 ± 6 нм в контроле), модуля Юнга ($125,73 \pm 4,48$ и $113,8 \pm 5,41$ кПа против $53,03 \pm 1,47$ кПа в контроле). К 21-м суткам величина указанных показателей снижалась в среднем в 2,7; 2,0 и 1,5 раза соответственно, что указывало на восстановление мембраны эритроцитов.

Заключение. Установлена зависимость формирования изменений и скорость их восстановления в мембране эритроцитов от плазмидного состава штаммов *Y. pestis*. Полученные данные способствуют пониманию процессов взаимодействия *Y. pestis* с мембраной эритроцитов и могут быть использованы как дополнительные характеристики при разработке новых критериев доклинической оценки средств специфической профилактики чумы.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, плазмиды pYT, pYV, pYP, атомно-силовая микроскопия, эритроциты; морские свинки, трансформированные формы, среднеквадратичная шероховатость поверхности эритроцитов, модуль Юнга

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 на заседании Комиссии по биоэтике Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 15.04.2022).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР АААА-А21-121012090064-0.

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

Для цитирования: Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л. Влияние *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом на мембрану эритроцитов в крови морских свинок. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):372–382.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>

Influence of *Yersinia pestis* with different plasmid composition on the erythrocyte membrane in the blood of guinea pigs

Svetlana N. Klyueva[✉], Svetlana A. Bugorkova, Pavel S. Erokhin, Anastasiya Yu. Goncharova, Aleksandr L. Kravtsov

Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. Based on data on the role of blood erythrocytes in the development and implementation of the vaccine and infectious processes in plague, it was of interest to evaluate changes in erythrocyte surface architecture from the position of searching for informative criteria for the preclinical evaluation of anti-plague vaccines.

Aim — using atomic force microscopy to characterize the state of the blood erythrocyte membrane of guinea pigs in response to subcutaneous administration of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG and its isogenic derivatives.

Materials and methods. For immunization of animals strain *Y. pestis* EV NIEG (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) and its isogenic derivatives *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM217 (pYT⁻, pYV⁺, pYP⁻), *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻) were used. Analysis of the erythrocyte membrane was carried out using a Solver P47-PRO scanning probe microscope (NT-MDT, Russia).

Results. The most pronounced changes in the surface architectonics of the membrane of guinea pig erythrocytes were established during the first three days of the formation of the immune response to the *Y. pestis* EV strain NIEG and its isogenic variant *Y. pestis* KM217, in the genome of which the pYV plasmid is preserved, administered at a dose of 5×10^8 CFU. A significant increase ($p < 0.05$) in the proportion of transformed cell forms ($43.67 \pm 3.63\%$ and $37.83 \pm 7.03\%$ versus $4.08 \pm 0.86\%$ in the control group), root mean square roughness (319 ± 8 nm and 312 ± 7 nm versus 70 ± 6 nm in the control group), Young's modulus (125.73 ± 4.48 kPa and 113.8 ± 5.41 kPa versus 53.03 ± 1.47 kPa in the control group). By the 21st day, the value of these indicators decreased by an average of 2.7, 2.0 and 1.5 times, respectively, indicating restoration of the erythrocyte membrane.

Conclusion. The dependence of the changes in the erythrocyte membrane and the rate of their restoration on the plasmid composition of *Y. pestis* strains has been established. The data obtained contribute to the understanding of the processes of interaction of *Y. pestis* with the erythrocyte membrane and can be used as additional characteristics in the development of new criteria for preclinical evaluation of plague candidate vaccines.

Keywords: *Yersinia pestis*, plasmids pYT, pYV, pYP, atomic force microscopy, guinea pig; red blood cells, transformed forms, root mean square roughness of the erythrocyte surface, Young's modulus

Ethics approval. 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, 07/23/2010). The study protocol was approved at a meeting of the Bioethics Commission of the FKUN Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor (protocol No. 3 of 04/15/2022).

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No AAAA-A21-121012090064-0.

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

For citation: Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L. Influence of *Yersinia pestis* with different plasmid composition on the erythrocyte membrane in the blood of guinea pigs. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):372–382.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-471>

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

Введение

В настоящее время сохраняется необходимость как в совершенствовании имеющихся средств иммунопрофилактики чумы, так и в разработке эффективных и безопасных новых препаратов, в том числе вакцин нового поколения, созданных на основе авирулентных штаммов *Yersinia pestis* с чётко контролируемыми генетическими дефектами [1, 2]. Наиболее сложной является доклиническая оценка вакцин, поскольку от информативности и адекватности используемых методов исследования на этом этапе будет зависеть качество готового препарата.

Основным индикатором, отражающим любые сдвиги в состоянии организма, является кровь, в составе которой одной из активно тестируемых клеточных групп являются эритроциты [3]. Эритроциты наряду с лейкоцитами и тромбоцитами включены в категорию защитных клеток, способных убивать бактерии, и являются участниками и

регуляторами реакций воспаления и врождённого иммунитета [4]. Эритроцитарные мембраны представляют собой твердоупругий белковый каркас, ячейки которого заполнены липидным бислоем [5]. Белковый каркас обладает высокой эластичностью и обуславливает вязкоупругие свойства интактных мембран. Плазмолемма эритроцитов содержит не менее 100 различных белков, формирующих цитоскелетный каркас, который придает эритроциту характерную двояковогнутую форму. Доказано, что отличие формы эритроцитов от нормальной двояковогнутой является показателем патологического процесса [6]. Изучена роль эритроцитов крови человека в процессах модуляции пролиферации и выживания Т-клеток посредством усиления секреции ряда цитокинов, индукции рецепторов интерлейкина-2 и регуляции соотношения CD4⁺/CD8⁺ [7–9]. Именно поэтому представляет интерес изучение поверхностной структуры эритроцита, являющегося своеобразной клеточной тест-системой при

различных физиологических, постинфекционных и поствакцинальных процессах.

Наиболее эффективным методом изучения состояния поверхностных мембран является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [10, 11], применяемая для оценки таких трехмерных параметров, как толщина (высота), объём, среднеквадратичная шероховатость поверхности, позволяющих характеризовать функциональное состояние клеток. Анализ силовых кривых по результатам АСМ направлен на количественное определение механических параметров: деформации, жесткости, модуля Юнга (МЮ) (важный количественный параметр, от которого существенно зависят реологические свойства крови, её текучесть по капиллярному руслу) [6, 12].

Экспериментально показано, что от плазмидного профиля изогенных производных вакцинного штамма чумного микроба зависит их иммуногенность [13], поэтому для поиска информативных критериев доклинической оценки живых чумных вакцин представляет интерес детализация процессов взаимодействия штаммов с различным плазмидным составом с эритроцитами крови.

Цель работы — методом АСМ охарактеризовать состояние мембраны эритроцитов в крови морских свинок в ответ на подкожное введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных.

Материалы и методы

Исследования проводили с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенными производными *Y. pestis* KM 216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pestis* KM 217 (pYT⁻, pYV⁺, pYP⁻), *Y. pestis* KM 218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), полученными из Государственной коллекции патогенных бактерий при Российском противочумном институте «Микроб». Штаммы *Y. pestis* выращивали на агаре LB (рН 7,2) в течение 48 ч при 28°C. Животных иммунизировали указанными штаммами *Y. pestis* в концентрациях 5×10^8 КОЕ и 5×10^5 КОЕ.

В качестве биомодели были выбраны морские свинки массой 35–400 г, полученные из питомника при Российском противочумном институте «Микроб». Из животных (50 особей) были сформированы 8 опытных групп по 6 особей в каждой и контрольная группа — интактные морские свинки (2 особи). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации¹ и международными принципами². Программа экспериментальной работы с животными

одобрена Комиссией по биоэтике при Российском противочумном институте «Микроб» (протокол № 3 от 15.04.2022).

На 1, 3 и 21-е сутки после иммунизации у морских свинок забирали кровь из ушной вены. Оценку состояния клеток проводили с помощью микроскопа «Olympus CX41» («Olympus») и цифровой камеры «VZ-C31S» («VideoZavt») в программе «VideoZavt v. 1.5». Подсчёт эритроцитов с характеристикой морфологии выполняли в 5 полях зрения, учитывая не менее 800 клеток.

Для АСМ кровь животных собирали в пробирки с 2,5% раствором глутаральдегида в соотношении 1 : 3 и фиксировали в течение 2,5 ч в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.3103-13 «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I–IV групп патогенности». Эритроциты осаждали центрифугированием при 1500 оборотах в течение 5 мин. Клетки дважды отмывали фосфатным буфером рН 7,4 при тех же условиях центрифугирования. Полученную взвесь клеток путём десятикратного разведения дистиллированной водой доводили до концентрации 3×10^6 клеток/л. Контроль абсолютного количества клеток в конечной пробе осуществляли подсчётом эритроцитов в камере Горяева, применяя световую микроскопию (увеличение $\times 400$).

Анализ проб осуществляли на сканирующем зондовом микроскопе «Solver P47-PRO» («NT-MDT») [10] в режиме прерывистого и непрерывного контакта с использованием кремниевых кантилеров «NSG01» («NT-MDT»); резонансная частота 120 кГц, константа жесткости 5,5 Н/м) и «CSG10» («NT-MDT»); резонансная частота 20 кГц, константа жесткости 0,1 Н/м) соответственно. Для обработки АСМ-изображений использовали программу «Nova» («NT-MDT»), позволяющую редактировать полученные АСМ-изображения, а также представлять их в трехмерном формате. На полях сканирования от 15×15 до 50×50 мкм² анализу подвергали поверхность отдельно лежащих эритроцитов. Визуализация результатов измерения состояла в представлении рельефа в виде топографической карты и трёхмерных изображений. На топографических картах проводили сечения, вдоль которых строили профиль поверхности и выполняли расчёт среднеквадратичной шероховатости мембран эритроцитов (Rq).

На каждом препарате в случайном порядке выбирали 10 эритроцитов, на мембране которых в 9 точках исследовали упругость мембраны с построением графика силовых кривых и с дальнейшим вычислением среднего арифметического значения МЮ по каждой сканированной клетке. МЮ применяли для оценки жёсткости мембран эритроцитов на основе модели Герца, описывающей упругую деформацию двух контактирующих тел [12]:

¹ Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

² Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 № 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях.

$$F = \frac{4}{3} \times E \times R^{0.5} \times h^{1.5},$$

где F — сила, действующая на образец; E — МЮ; R — радиус зонда; h — глубина прогиба мембраны. С учётом радиуса закругления кантилеверов, которые использовали в данном исследовании, вывели формулу определения МЮ (кПа):

$$E = \frac{3}{4} \times F/R^{0.5} \times h^{1.5}.$$

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica v. 10.0» («StatSoft Inc.»). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционную связь считали сильной при коэффициенте корреляции $r = 0,7-1,0$, умеренной (средней) силы — при $r = 0,3-0,7$, слабой — при $r = 0-0,3$, характер связи (прямая, обратная) определяли по знаку (+; -) перед значением. Корреляционную связь считали достоверной при $p < 0,05$. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t -критерия Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — ошибка среднего арифметического.

Результаты

Эритроциты интактных морских свинок при наблюдении в световом микроскопе в стандартном режиме светлого поля представляли собой оптически контрастные объекты округлой формы (рис. 1, а). В ответ на иммунизацию морских свинок штаммами *Y. pestis* в крови происходило изме-

нение формы и размеров эритроцитов, появлялись эритроциты трансформированной формы (эхиноциты (рис. 1, б), сфероциты, кодоциты).

Методом АСМ установлено, что в крови интактных морских свинок абсолютное большинство эритроцитов (до 96%) было представлено двояковогнутыми дискоцитами (рис. 2, а), с гладкой поверхностью, с утолщениями по краям (тор) и центральной впадиной (пеллор). Средний диаметр клетки составлял $6,0 \pm 0,2$ мкм, что укладывается в диапазон значений диаметра нормальных эритроцитов у данного вида лабораторных животных ($4,3-7,0$ мкм) [14]. По данным АСМ, высота тора дискоцитов не превышала $1,3 \pm 0,1$ мкм, а глубина впадины — $0,47 \pm 0,04$ мкм (рис. 3, а).

Атипичные формы клеток, которые появлялись в результате воздействия штаммов *Y. pestis*, — это эхиноциты (рис. 2, б, в), сфероциты (рис. 2, б), кодоциты (рис. 2, г) и плоские клетки. Анализ гистограмм нормальных эритроцитов и трансформированных форм (ТФ) показал, что у неизменённых форм типичный двояковогнутый профиль клетки на кривой сечения представлен двумя равномерными синусоидами (рис. 3, а), в то время как у ТФ были выявлены выраженные изменения структуры мембранной поверхности. Любое нарушение в рельефе эритроцита отражалось на изменении профиля клетки, представленного в гистограммах (рис. 3, б-г).

Среди изменённых форм эритроцитов большинство ($65,2 \pm 2,6\%$) приходилось на долю эхиноцитов с единичными и множественными выростами толщиной 220 ± 30 нм, равномерно распределёнными на поверхности клетки (рис. 3, б). На долю ко-

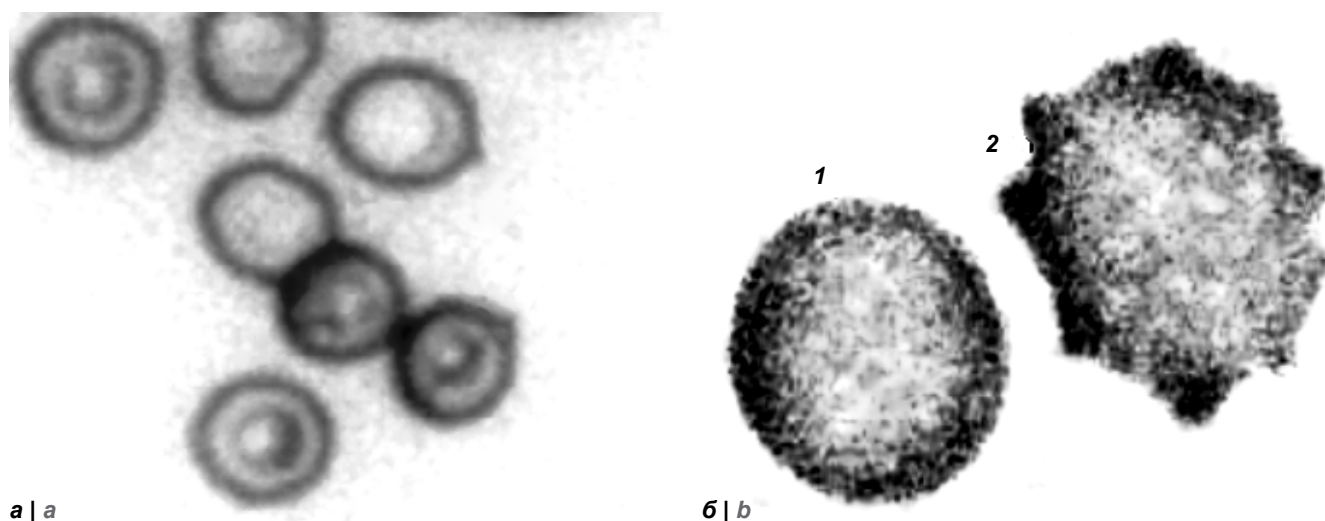


Рис. 1. Эритроциты морской свинки (световая микроскопия без окраски).

а — эритроциты интактной морской свинки ($\times 400$); б — эритроциты морской свинки, иммунизированной *Y. pestis* EV НИИЭГ ($\times 1000$):
1 — дискоцит; 2 — эхиноцит.

Fig. 1. Guinea pig erythrocytes (light microscopy without staining).

а — intact guinea pig erythrocytes ($\times 400$); б — guinea pig erythrocytes immunized with *Y. pestis* EV NIEG ($\times 1000$): 1 — discocyte; 2 — echinocyte.

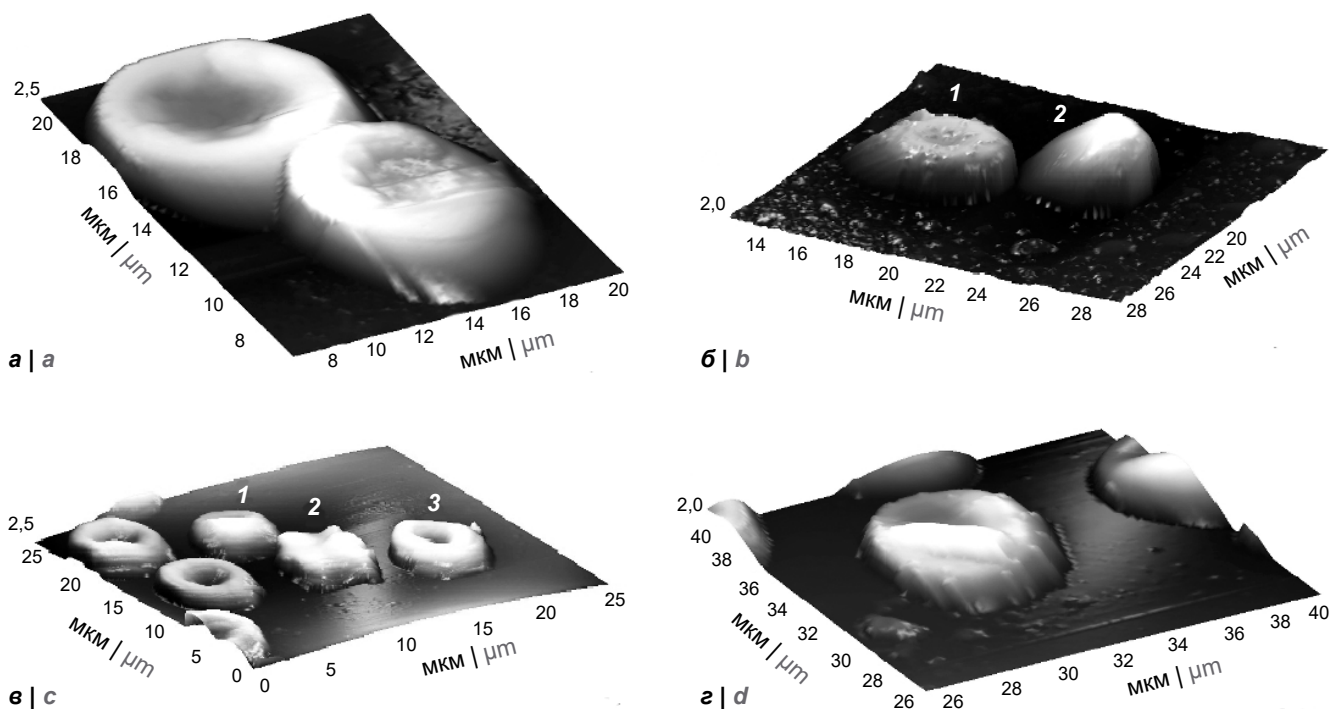


Рис. 2. Трёхмерные АСМ-изображения эритроцитов морской свинки, иммунизированной *Y. pestis* EV НИИЭГ.

a — дискоциты, $20 \times 20 \text{ мкм}^2$; **б:** 1 — эхиноцит, 2 — сфероцит, $15 \times 15 \text{ мкм}^2$; **в:** 1 — кодоцит, 2 — эхиноцит, 3 — дискоцит, $25 \times 25 \text{ мкм}^2$; **г** — кодоцит, $15 \times 15 \text{ мкм}^2$.

Fig. 2. 3D AFM images of erythrocytes from a guinea pig immunized with *Y. pestis* EV NIIЭГ.

a — discocytes, $20 \times 20 \text{ }\mu\text{m}^2$; **b:** 1 — echinocyte, 2 — spherocyte, $15 \times 15 \text{ }\mu\text{m}^2$; **c:** 1 — codocyte, 2 — echinocyte, 3 — discocyte, $25 \times 25 \text{ }\mu\text{m}^2$; **d** — codocyte, $15 \times 15 \text{ }\mu\text{m}^2$.

доцитов (в середине клетки находится не пэллор, а выпуклость или мишень — утолщение, в котором скапливается гемоглобин) и сфероцитов (эритроциты, имеющие неправильную, сферическую форму) приходилось $32,4 \pm 1,2\%$. Диаметр мишени кодоцитов не превышал $3,0 \pm 0,5 \text{ мкм}$, что составляет почти 40% диаметра клетки (рис. 3, в). Высота мишеневидной структуры составляла $0,70 \pm 0,01 \text{ мкм}$, что в 1,7 раза меньше высоты остальной части клетки ($1,2 \pm 0,1 \text{ мкм}$). Профиль сфероцита имел вид купола высотой $2,5 \pm 0,2 \text{ мкм}$ и диаметром $6,0 \pm 0,3 \text{ мкм}$ (рис. 3, г). Плоские клетки, на долю которых приходилось всего $2,0 \pm 0,5\%$, представляли собой диски с гладкой ровной поверхностью диаметром $7,5 \pm 0,5 \text{ мкм}$ и толщиной $0,40 \pm 0,05 \text{ мкм}$, без углубления в центре.

Анализ результатов АСМ эритроцитов в опытных группах позволил количественно сравнить степень и характер воздействия вакцинного штамма *Y. pestis* EV и его изогенных производных на поверхностную структуру эритроцитов в крови морских свинок (табл. 1). Наиболее значимые различия, характеризующиеся повышением (в среднем в 8,6 раза) ТФ эритроцитов по сравнению с контролем ($p < 0,05$), установлены в течение первых 3 сут в отношении штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ и *Y. pestis* KM 217, общим для которых является наличие в составе плазмиды pYV (45 мДа), с наличием которой

связывают клеточную адгезию, аутоагглютинацию, поверхностную агглютинацию, а также синтез белков наружной мембраны, в том числе V- и W-антигенов и других белков, действие которых направлено на подавление фагоцитарной активности клеток иммунной системы, а следовательно, обеспечение лучшей приживаемости вакцинных штаммов. К 21-м суткам количество ТФ эритроцитов в этих группах достоверно снижалось в среднем в 2,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с 1-ми сутками, но продолжало в среднем в 3 раза превышать аналогичный показатель в группе интактного контроля. Следует отметить влияние дозы *Y. pestis* EV НИИЭГ на количество ТФ эритроцитов на 3-и сутки иммуногенеза. Так, применение *Y. pestis* EV НИИЭГ в высокой дозе ($5 \times 10^8 \text{ КОЕ}$) вызывало увеличение ТФ в 1,5 раза ($p < 0,05$) больше, чем на введение низкой дозы ($5 \times 10^5 \text{ КОЕ}$). Количество ТФ в ответ на иммунизацию *Y. pestis* KM 216 — штаммом, в составе которого имелась лишь одна плазида pYР, детерминирующая синтез бактериоцина (пестицин 1) и активатора плазминогена, впрочем, как и на введение штамма *Y. pestis* KM 218, лишённого всех 3 ключевых плазмид чумного микроба, увеличивалось на 1-е и 3-и сутки в среднем в 3,6 раза по сравнению с аналогичным показателем в интактном контроле, но на 21-е сутки достоверного отличия по этому показателю от интактного контроля не выявлено.

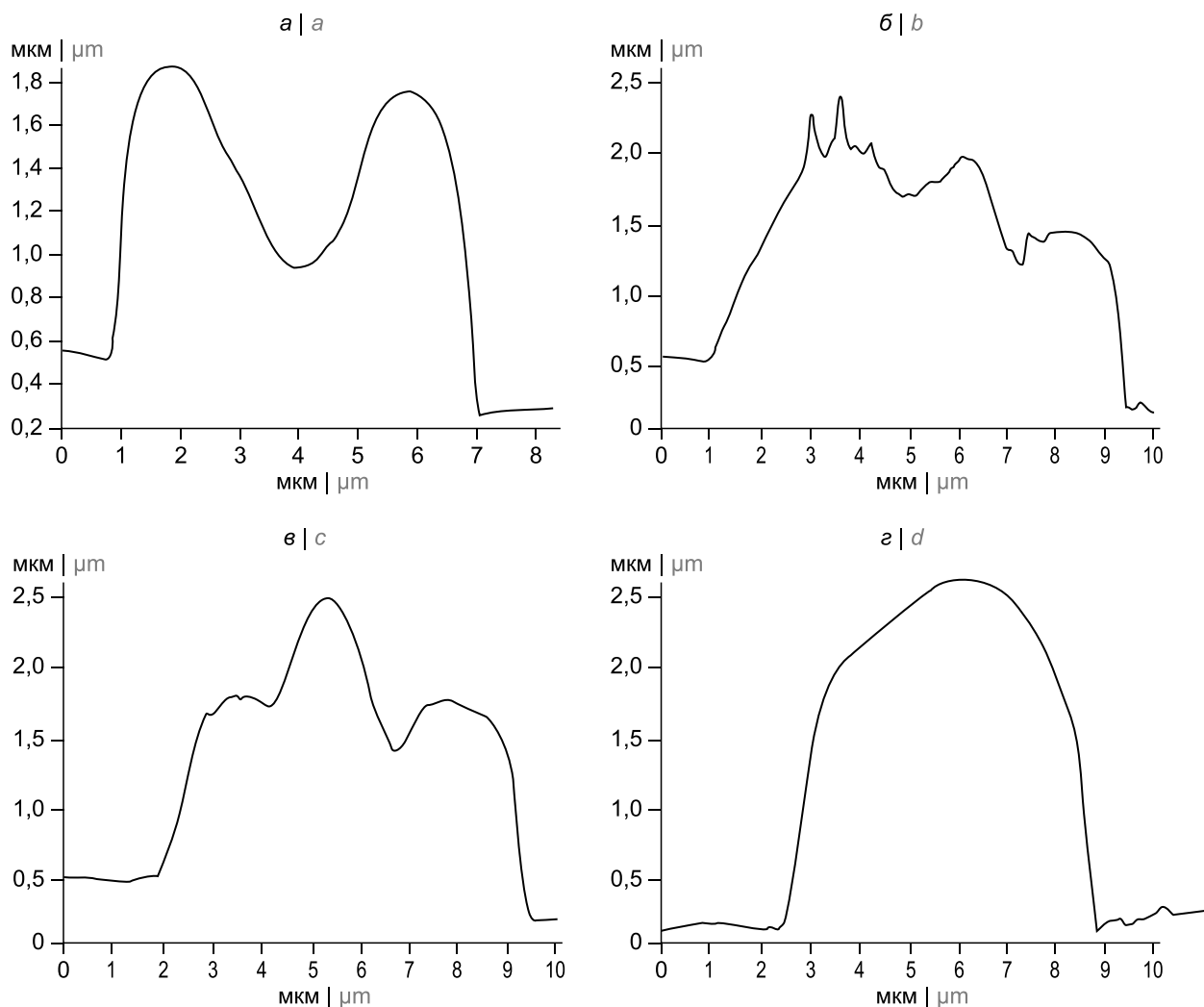


Рис. 3. Профили различных форм эритроцитов морской свинки, иммунизированной *Y. pestis* KM 217.

a — дискоцит; *b* — эхиноцит; *c* — кодоцит; *d* — сфероцит.

Fig. 3. Profiles of various forms of erythrocytes from a guinea pig immunized with *Y. pestis* KM 217.

a — discocyte; *b* — echinocyte; *c* — codocyte; *d* — spherocyte.

Таблица 1. Количество трансформированных форм эритроцитов в ответ на иммунизацию морских свинок штаммами *Y. pestis* с различной изогенной структурой по данным АСМ

Table 1. The number of transformed forms of erythrocytes in response to immunization of guinea pigs with *Y. pestis* strains with different isogenic structures according to AFM data

Штамм Strain	Группа Group	Иммунизирующая доза, КОЕ Immunizing dose, CFU	Количество клеток, % Number of cells, %		
			1-е сутки 1 st day	3-и сутки 3 rd day	21-е сутки 21 st day
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	1	5×10^5	$28,71 \pm 6,24^*$	$28,09 \pm 3,83^{**}$	$11,43 \pm 1,47^{*o}$
	2	5×10^8	$37,5 \pm 5,07^*$	$43,67 \pm 3,63^{**}$	$15,15 \pm 2,02^{*3}$
<i>Y. pestis</i> KM 216	3	5×10^5	$13,57 \pm 4,13^*$	$17,66 \pm 3,48^*$	$8,0 \pm 2,12$
	4	5×10^8	$18,33 \pm 4,26^*$	$20,77 \pm 4,54^*$	$9,17 \pm 3,29$
<i>Y. pestis</i> KM 217	5	5×10^5	$34,45 \pm 5,23^*$	$35,47 \pm 6,85^*$	$10,65 \pm 2,56^{*o}$
	6	5×10^8	$36,15 \pm 6,07^*$	$37,83 \pm 7,03^*$	$14,58 \pm 4,84^{*o}$
<i>Y. pestis</i> KM 218	7	5×10^5	$11,89 \pm 3,71^*$	$16,71 \pm 2,72^*$	$6,29 \pm 2,87$
	8	5×10^8	$16,85 \pm 2,74^*$	$19,65 \pm 3,27^*$	$9,09 \pm 2,3$
Контроль Control	9	—		$4,08 \pm 0,86$	

Примечание. Здесь и в табл. 2: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ различия между дозами; $^o p < 0,05$ по сравнению с 1-ми сутками.

Note. Here and in the Table 2: * $p < 0.05$ compared with control; ** $p < 0.05$ differences: between doses; $^o p < 0.05$ compared with 1st day.

В дальнейших исследованиях с целью характеристики клеточной поверхности был использован параметр функциональных изменений рельефа эритроцита — Rq [10]. В течение первых 3 сут показатель Rq мембран эритроцитов всех иммунных морских свинок достоверно превышал ($p < 0,05$) соответствующее значение в контроле (табл. 2). Наиболее значимые различия в значениях Rq установлены в отношении *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) в зависимости от дозы во все сроки иммунного ответа. Так, при использовании вышеперечисленных штаммов в высокой дозе (5×10^8 КОЕ) величина Rq в среднем в 1,7 раза превышала ($p < 0,05$) соответствующие величины при низкой дозе (5×10^5 КОЕ). На 21-е сутки зарегистрировано статистически значимое снижение показателя Rq при иммунизации животных штаммами *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺), *Y. pestis* KM 216 (pYP⁺), *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) в обеих дозах по сравнению с аналогичными показателями на 1-е сутки иммунного ответа ($p < 0,05$).

Деформационную способность эритроцитов морских свинок оценивали с помощью МЮ. Средние значения МЮ во всех опытных группах на протяжении с 3-х по 21-е сутки превосходили контрольный показатель (табл. 2). Наибольшие значения МЮ регистрировали на 3-и сутки иммуногенеза при иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ, особенно при инокуляции вакцинного штамма в дозе 5×10^8 КОЕ по сравнению с 1-ми сутками и контролем ($p < 0,05$). В случае применения штамма *Y. pestis* KM 216 (pYP⁺) в дозе 5×10^5 КОЕ к 21-м суткам иммуногенеза величина МЮ достоверно превышала значения 1-х суток ($p < 0,05$). При использова-

нии бесплазмидного штамма *Y. pestis* KM 218 (7-я и 8-я группы) показатель МЮ оставался на уровне 1-х суток. И, наоборот, при иммунизации морских свинок штаммами *Y. pestis* EV НИИЭГ, содержащего 3-и основные плазмиды (1-я и 2-я группы) и *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) (5-я и 6-я группы), величина МЮ достоверно снижалась ($p < 0,05$) по сравнению с показателями, установленными в 1-е сутки.

Далее был проведён корреляционный анализ зависимости параметров, характеризующих поверхностную архитектуру мембраны эритроцитов (ТФ, Rq, МЮ), от плазмидного состава штаммов *Y. pestis*. В результате выявлена прямая умеренной силы связь между показателем Rq и наличием у штамма *Y. pestis* плазмиды pYV и/или pYP ($r = 0,5$; $p = 0,04$).

Обсуждение

В результате проведённого исследования наглядно продемонстрировано вовлечение эритроцитов крови морских свинок в процессы взаимодействия со штаммами *Y. pestis*, характер которого зависел от их плазмидного состава. Результатом такого взаимодействия было формирование ряда структурных преобразований мембраны клетки макроорганизма и, следовательно, изменение её функции. По нашим данным, большинство трансформированных форм эритроцитов составляли эхиноциты ($65,2 \pm 2,6\%$), а также кодоциты и сфероциты ($32,4 \pm 1,2\%$). Всего $2,0 \pm 0,5\%$ эритроцитов приходилось на долю плоских клеток, которые, по данным литературы [15], вероятнее всего, являются разновидностью молодых форм эритроцитов.

Основные изменения поверхностной архитектуры эритроцитов происходили в течение первых

Таблица 2. Динамика изменения АСМ-параметров поверхности эритроцитов морских свинок в ответ на иммунизацию морских свинок штаммами *Y. pestis* с различной изогенной структурой по данным АСМ

Table 2. Dynamics of changes in AFM parameters of the surface of guinea pig erythrocytes in response to immunization of guinea pigs with *Y. pestis* strains with different isogenic structures according to AFM data

Группа Group	Штамм Strain	Иммуни- зирующая доза, КОЕ Immunizing dose, CFU	АСМ-параметры AFM parameters					
			1-е сутки 1 st day		3-и сутки 3 rd day		21-е сутки 21 st day	
			Rq, нм Rq, nm	МЮ, кПа MU, kPa	Rq, нм Rq, nm	МЮ, кПа MU, kPa	Rq, нм Rq, nm	МЮ, кПа MU, kPa
Контроль Control		—	70 ± 6	53,03 ± 1,47	72 ± 6	54,03 ± 1,79	68 ± 6	52,03 ± 1,62
1	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	5×10^5	131 ± 7**	95,25 ± 2,86**	137 ± 6**	125,00 ± 3,75**°	111 ± 7**°	61,14 ± 2,46**°
2	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	5×10^8	319 ± 8**	125,73 ± 4,48**	183 ± 7**°	142,58 ± 5,98**°	150 ± 8**°	77,92 ± 3,73**°
3	<i>Y. pestis</i> KM 216	5×10^5	129 ± 8*	62,28 ± 2,87	179 ± 9*°	70,02 ± 2,76*	101 ± 8*°	80,27 ± 2,76*°
4	<i>Y. pestis</i> KM 216	5×10^8	153 ± 9*	72,11 ± 2,16*	203 ± 9*°	80,08 ± 3,73*	110 ± 9*°	76,98 ± 3,82*
5	<i>Y. pestis</i> KM 217	5×10^5	228 ± 7**	101,13 ± 3,04*	201 ± 7**°	76,14 ± 2,28*°	88 ± 5**°	80,60 ± 2,42*°
6	<i>Y. pestis</i> KM 217	5×10^8	312 ± 7**	113,80 ± 5,41*	280 ± 8**°	81,61 ± 2,45*°	164 ± 6**°	84,41 ± 2,53*°
7	<i>Y. pestis</i> KM 218	5×10^5	90 ± 5	65,80 ± 1,98*	101 ± 4*	71,22 ± 2,32*	71 ± 5#	68,52 ± 2,29*
8	<i>Y. pestis</i> KM 218	5×10^8	110 ± 10*	74,70 ± 2,24*	111 ± 6*	80,37 ± 2,47*°	104 ± 6**	77,55 ± 2,51*

3 сут после введения вакцинного штамма и его изогенных производных, что укладывается в рамки, предусмотренные развитием нестерильной фазы иммунитета, сопряжённой с активным размножением бактерий в месте введения, регионарных лимфатических узлах и во внутренних органах (селезёнка, печень, лёгкие) [16]. Степень выраженности этих изменений зависела от плазмидного состава штаммов, взятых в исследование, и их иммунизирующей дозы. Эти данные согласуются с ранее полученной информацией о различной способности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных индуцировать на 1-е сутки иммуногенеза секреторную дегрануляцию нейтрофилов крови морских свинок с высвобождением во внеклеточное пространство лейкоцитарной эластазы [17], которая, вызывая деструкцию белкового каркаса эритроцитов [18], может индуцировать появление в крови большого количества эхиноцитов и других морфологически изменённых форм эритроцитов [19].

В первые 3 сут иммунного ответа максимальное количество трансформированных эритроцитов обнаружено в ответ на иммунизацию полноценным по плазмидному составу штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и моноплазмидным штаммом *Y. pestis* KM 217, содержащим плазмиду pYV, кодирующую белки системы секреции III типа (T3SS), эффекторные белки Yops (YopE, YopH, YopM, YopP, YopT, YopO) и регуляторные белки [20]. С одной стороны, эффекторные белки Yops эффективно активизируют патогенные виды иерсиний для подавления врождённого иммунного ответа хозяина путём регуляции запрограммированной гибели клеток, а также для ингибирования фагоцитоза и продукции ряда провоспалительных цитокинов [21], нарушая актиновый цитоскелет клеток хозяина, а с другой — поверхностно расположенные белки внешней мембраны (Yops), кодируемые плазмидой pYV *Y. pestis*, являются наиболее перспективными мишенями для иммунопрофилактики и иммунотерапии чумы [22].

Известно, что плазмиды pYV является генетическим элементом, имеющим решающее значение для патогенности, ответственной за мощную инвазивную способность возбудителя чумы *Y. pestis* и его геморрагические свойства [23]. Попадая в кровь, штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ вступает во взаимодействие с эритроцитами крови. Так, ранее в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* была обнаружена способность штаммов *Y. pestis*, независимо от их фенотипа, сопряжённого с пигментацией (Pgm⁺/Pgm⁻), и плазмидного профиля, проникать внутрь эритроцитов человека и мыши и разрушать их мембрану [24]. Кроме того, штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ обладает выраженными адгезивными свойствами к эритроцитам человека в результате гидрофобных взаимодействий, которые обусловлены поверхностными структурами микробных клеток, относящи-

мися к липопротеидам [25], что обуславливает его влияние на мембрану клетки.

Наименьшее количество трансформированных эритроцитов обнаружено в ответ на иммунизацию моноплазмидным штаммом *Y. pestis* KM216, содержащим только плазмиду пестициногенности pYP, и бесплазмидным штаммом *Y. pestis* KM 218, что сопряжено с их низкой иммуногенностью на фоне слабой приживаемости в макроорганизме [13]. К тому же штаммы чумного микроба, отличающиеся по плазмидному профилю, в частности, отсутствию плазмид (pYP, pYV), обладают низкой адгезивной активностью к эритроцитам и легко поглощаются фагоцитами при введении лабораторным животным [26].

В нашем исследовании выявлено изменение прогиба мембраны эритроцита при взаимодействии клеток с *Y. pestis*, обусловленное изменением упругих свойств мембраны, имеющим место в 1-е сутки иммуногенеза, и постепенно проходящее к 21-м суткам наблюдения [27]. Изменение величины прогиба мембраны сопряжено с нарушением её формы, когда уменьшается островеершинность края эритроцита, пропадает линейный участок между центром эритроцита и его краем, координаты максимума на срезе мембраны становятся размытыми, а если прогиб исчезает полностью, то поверхность мембраны становится выпуклой, что сказывается на процессах микроциркуляции в тканях.

Ещё одним параметром, используемым для анализа АСМ-изображений поверхности клеток, является шероховатость, показывающая отклонение рельефа клеточной поверхности от среднего значения. Наиболее выраженное воздействие на величину среднеквадратичной шероховатости поверхности (Rq) эритроцитов в крови морских свинок оказывал штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенный вариант *Y. pestis* KM 217 (pYV⁺) при применении в высокой дозе (5×10^8 КОЕ). Согласно результатам ряда исследований, повышение величины Rq обусловлено образованием выпячиваний интегральных белков из липидного бислоя мембраны эритроцита [28, 29], косвенным свидетельством чего является активация процессов перекисного окисления липидов [30]. В этой связи выявленная корреляционная связь между наличием плазмиды pYV и pYP у изученных штаммов чумного микроба и показателем Rq, по-видимому, объясняется повышенной адгезивной способностью штаммов, содержащих pYV и pYP [26], и укладывается в ранее описанную динамику изменения поверхностной архитектоники эритроцитов на живые вакцины в различные сроки после иммунизации биомодели [3].

Установленное нами достоверное повышение МЮ на 3-и сутки иммуногенеза под влиянием полноплазмидного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ является свидетельством снижения эластичности и вязкости

клеточной мембраны и повышения её жёсткости [31]. Однако на момент формирования иммунного ответа в стерильной фазе иммунитета (21-е сутки) этот показатель существенно снижался, что указывает на восстановление параметров клеточной мембраны эритроцитов (повышение эластичности и увеличение вязкости при одновременном снижении жёсткости клеточной мембраны эритроцита).

Происходящие в первые 3 сут после иммунизации полноплазмидным вакцинным штаммом *Y. pestis* EV структурные изменения в мембране эритроцитов морских свинок сопряжены с высокой способностью этого штамма приживаться в клетках и тканях макроорганизма, следствием чего является его высокая иммуногенность. Это согласуется с результатами исследования сравнительной иммуногенности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных, продемонстрировавшего прямую зависимость этого показателя от наличия рУТ, рУV и рУР [13].


Таким образом, полученные данные, иллюстрирующие динамику изменения поверхностной архитектоники мембраны эритроцитов в процессе иммуногенеза в ответ на вакцинный штамм чумного микроба и его изогенные производные, не только способствуют пониманию отдельных этапов взаимодействия микро- и макроорганизма, но могут быть использованы как дополнительные характеристики при разработке новых информативных критериев доклинической оценки средств специфической профилактики чумы.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Byvalov A.A., Konyshev I.V., Uversky V.N., et al. *Yersinia* outer membrane vesicles as potential vaccine candidates in protecting against plague. *Biomolecules*. 2020;10(12):1694. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10121694>
- Cote C.K., Biryukov S.S., Klimko C.P., et al. Protection elicited by attenuated live *Yersinia pestis* vaccine strains against lethal infection with virulent *Y. pestis*. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(2):161. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9020161>
- Бугоркова С.А., Ключева С.Н. Топографическая характеристика состояния мембран эритроцитов крови при экспериментальном вакцинном процессе. *Морфологические ведомости*. 2015;(2):21–7. Bugorkova S.A., Klyueva S.N. Topographical features state of erythrocyte membranes blood experimental vaccines process. *Morphological Newsletter*. 2015;(2):21–7. EDN: <https://elibrary.ru/vkztiv>
- Серебряная Н.Б., Якуцени П.П. Эритроциты как бактерицидные клетки, участники и регуляторы воспаления. *Иммунология*. 2020;41(5):458–69. Serebryanaya N.B., Yakutseni P.P. Red blood cells as bactericidal cells, participants and regulators of inflammation. *Immunology*. 2020;41(5):458–69. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-5-458-469> EDN: <https://elibrary.ru/ipqyca>
- Li H., Lykotraftitis G. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. *Biophys. J.* 2014;107(3):642–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.031>
- Spyratou E., Dilvoi M., Patatoukas G., et al. Probing the effects of ionizing radiation on young's modulus of human erythrocytes cytoskeleton using atomic force microscopy. *J. Med. Phys.* 2019;44(2):113–7. DOI: https://doi.org/10.4103/jmp.JMP_95_18
- Fonseca A.M., Pereira C.F., Porto G., Arosa F.A. Red blood cells promote survival and cell cycle progression of human peripheral blood T cells independently of CD58/LFA-3 and heme compounds. *Cell. Immunol.* 2003;224(1):17–28. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0008-8749\(03\)00170-9](https://doi.org/10.1016/s0008-8749(03)00170-9)
- Porto B., Fonseca A.M., Godinho I., et al. Human red blood cells have an enhancing effect on the relative expansion of CD8⁺ T-lymphocytes *in vitro*. *Cell Prolif.* 2001;34(6):359–67. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2001.00222.x>
- Kalechman Y., Herman S., Gafter U., Sredni B. Enhancing effects of autologous erythrocytes on human or mouse cytokine secretion and IL-2R expression. *Cell. Immunol.* 1993;148(1):114–29. DOI: <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1095>
- Ерохин П.С., Осина Н.А., Уткин Д.В. и др. Параметрическая оценка состояния бактериальных клеток, исследованных методом атомно-силовой микроскопии. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020;16(2):66–71. Erokhin P.S., Osina N.A., Utkin D.V., et al. Parametric assessment of bacterial cells studied using atomic force microscopy. *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2020;16(2):66–71. EDN: <https://elibrary.ru/vwstesz>
- Yu Y., Yoshimura S.H. Investigating the morphological dynamics of the plasma membrane by high-speed atomic force microscopy. *J. Cell Sci.* 2021;134(17):jcs243584. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.243584>
- Шерстюкова Е.А., Иноземцев В.А., Козлов А.П. и др. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. *Альманах клинической медицины*. 2021;49(6):427–34. Sherstyukova E.A., Inozemtsev V.A., Kozlov A.P., et al. Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):427–34. DOI: <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2021-49-059> EDN: <https://elibrary.ru/hvrlj>
- Анисимова Т.И., Саяпина Л.В., Ледванов М.Ю. и др. Усовершенствование требований к неклиническим испытаниям штаммов чумного микроба, перспективных в качестве вакцинных. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2003;3(3):9–12. Anisimova T.I., Sayapina L.V., Ledvanov M.Yu., et al. Improving the requirements for non-clinical testing of plague microbe strains that are promising as vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2003;3(3):9–12.
- Любин Н.А., Конова Л.Б. Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у сельскохозяйственных и лабораторных животных при патологиях. Ульяновск; 2005. Lyubin N.A., Konova L.B. Guidelines for the determination and derivation of hemograms in agricultural and laboratory animals with pathologies. Ulyanovsk; 2005. EDN: <https://elibrary.ru/ysfszt>
- Мороз В.В., Мягкова Е.А., Сергунова В.А. и др. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2013;9(3):14–23. Moroz V.V., Myagkova E.A., Sergunova V.A., et al. Morphological features of red blood cells in patients with severe concomitant injury. *General Reanimatology*. 2013;9(3):14–23. DOI: <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2013-3-14> EDN: <https://elibrary.ru/lhegxn>
- Самойлова Л.В., Пионтковский С.А., Плотникова Е.А. и др. Особенности размножаемости вирулентного и вакцинного штаммов чумного микроба в организме морских свинок. В кн.: Горькова А.В., ред. *Профилактика особо опасных*

- инфекций. Саратов;1988:3–13. Samoilova L.V., Piontkovsky S.A., Plotnikova E.A., et al. Peculiarities of multiplication of virulent and vaccine strains of the plague microbe in the body of guinea pigs. In: Gor'kova A.V., ed. *Prevention of Especially Dangerous Infections*. Saratov;1988:3–13.
17. Кравцов А.Л., Шведун Г.П., Ледванов М.Ю. О действии продуктов плазмид *Y. pestis* на лейкоциты крови морских свинок в процессе иммуногенеза при чуме по данным цитофлуориметрического анализа. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1993;(3):135–46. Kravtsov A.L., Shvedun G.P., Ledvanov M.Yu. On the effect of *Y. pestis* plasmid products on the blood leukocytes of guinea pigs during the process of immunogenesis during plague according to cytofluorimetric analysis. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 1993;(3):135–46.
18. Bykowska K., Duk M., Kusnierz-Alejska G., et al. Degradation of human erythrocyte surface components by human neutrophil elastase and cathepsin G: preferential digestion of glycoproteins. *Br. J. Haematol.* 1993;84(4):736–42. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03154.x>
19. Wong K.H.K., Sandlin R.D., Carey T.R., et al. The role of physical stabilization in whole blood preservation. *Sci. Rep.* 2016;6:21023. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep21023>
20. Соколова Е.П., Зюзина В.П., Демидова Г.В. и др. Роль резидентных плазмид pMT1, pCD1 и pPCP1 *Yersinia pestis* в образовании экстрацеллюлярной формы липополисахарида. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):85–9. Sokolova E.P., Zyuzina V.P., Demidova G.V., et al. The role of *Yersinia pestis* resident plasmids pMT1, pCD1, and pPCP1 in the production of lipopolysaccharide extracellular form. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):85–9. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-85-89> EDN: <https://elibrary.ru/zhgwbx>
21. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J. Biol. Chem.* 2016;7(1):1–13. DOI: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.1>
22. Красильникова Е.А., Трунякова А.С., Вагайская А.С. и др. Подбор новых молекулярных мишеней для оптимизации вакцинопрофилактики и терапии чумы. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):265–82. Krasil'nikova E.A., Trunyakova A.S., Vagaiskaya A.S., et al. A search for new molecular targets for optimizing plague preventive vaccination and therapy. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(2):265–82. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SNM-1254> EDN: <https://elibrary.ru/dvevgt>
23. Mikaty G., Coullon H., Fiette L., et al. The invasive pathogen *Yersinia pestis* disrupts host blood vasculature to spread and provoke hemorrhages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(10):e0009832. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009832>
24. Федорова В.А., Девдариани З.Л. Механизм взаимодействия *Yersinia pestis* с эритроцитами и его значение для патогенеза чумы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2007;(1):13–8. Fyodorova V.A., Devdanani Z.L. The mechanism of interaction between *Yersinia pestis* and erythrocytes, and its importance for the pathogenesis of plague. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2007;(1):13–8 EDN: <https://elibrary.ru/hylolr>
25. Пименов Е.В., Оборин В.А., Ивонин А.Г. Исследование механизмов взаимодействия бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012;(4):54–7. Pimenov E.V., Oborin V.A., Ivonin A.G. Investigation of mechanisms of interaction of *Yersinia pestis* EV НИИЭГ vaccine strain bacteria with human red blood cells. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012;(4):54–7. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-4-54-57> EDN: <https://elibrary.ru/pmdkuj>
26. Дубровина В.И., Мухтургин Г.Б., Балахонов С.В. и др. Изучение иммунофизиологических свойств штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2013;(6):136–9. Dubrovina V.I., Mukhturgin G.B., Balakhonov S.V., et al. Studying of immunophysiological properties of *Yersinia pestis* strains with various plasmid composition. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2013;(6):136–9. EDN: <https://elibrary.ru/rwbmox>
27. Нагорнов Ю.С. Метод определения внутриклеточного давления эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии. Часть 2. Экспериментальные исследования. *Наука. Мысль: электронный периодический журнал*. 2016;6(6-2):23–4. Nagornov Yu.S. Method for determining the intracellular pressure of erythrocytes according to atomic force microscopy. Part 2. Experimental studies. *A science. Thought: Electronic Periodical Journal*. 2016;6(6-2):23–34. EDN: <https://elibrary.ru/wadntr>
28. Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А. Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии. *Вестник Омского университета*. 2013;(2):129–32. Lobov I.A., Davletkildeev N.A. Effect of sample preparation technique on morphofunctional parameters of erythrocytes is studied by atomic force microscopy. *Herald of Omsk University*. 2013;(2):129–32. EDN: <https://elibrary.ru/pxrlpm>
29. Ващенко В.И., Вильянинов В.Н., Скрипай Л.А., Сороколетова Е.Ф. Везикуляция эритроцитов человека и её роль в донорских эритроцитсодержащих компонентах. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2020;(1):173–9. Vashchenko V.I., Vil'yaninov V.N., Skripai L.A., Sorokoletova E.F. Vesicle red blood cells. Its role in donor erythrocytes components. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2020;(1):173–9. EDN: <https://elibrary.ru/rftpsc>
30. Мороз В.В., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. и др. Изменения ультраструктуры поверхности мембран эритроцитов после кровопотери и их коррекция лазерным облучением. *Общая реаниматология*. 2010;6(2):5–9. Moroz V.V., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S., et al. Changes in the surface of red blood cell membranes after blood loss and their correction with laser irradiation. *General Reanimatology*. 2010;6(2):5–9. DOI: <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2010-2-5>
31. Белова Л.А., Машин В.В., Прошин А.Н., Костишко Б.В. Воздействие вазонита на структурно-функциональное состояние цитоплазматической мембраны эритроцитов больных с ишемическим инсультом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015;115(3):83–5. Belova L.A., Mashin V.V., Proshin A.N., Kostishko B.V. The effect of vasonit on the structural/functional state of erythrocyte cytoplasmic membrane in patients with ischemic stroke. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2015;115(3):83–5. DOI: <https://doi.org/10.17116/jnevro20151153183-85> EDN: <https://elibrary.ru/tvujpz>

Информация об авторах

Клюева Светлана Николаевна  — к.б.н., н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, klyueva.cvetlana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., г.н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Ерохин Павел Сергеевич — к.б.н., н.с. отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2175-5333>


Гончарова Анастасия Юрьевна — к.м.н., н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Кравцов Александр Леонидович — д.б.н., в.н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Участие авторов: *Клюева С.Н.* — проведение исследований, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание статьи; *Бугоркова С.А.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Ерохин П.С.* — проведение исследований методом атомно-силовой микроскопии, редактирование; *Гончарова А.Ю.* — проведение исследований; *Кравцов А.Л.* — концепция исследования, 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 01.02.2024;
принята к публикации 03.04.2024;
опубликована 29.06.2024

Information about the authors

Svetlana N. Klyueva  — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, klyueva.cvetlana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), chief researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Pavel S. Erokhin — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2175-5333>

Anastasiya Yu. Goncharova — Cand. Sci. (Med.), researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Aleksandr L. Kravtsov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Immunology department Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Author contribution: *Klyueva S.N.* — conducting research, collecting and processing material, statistical processing, writing the article; *Bugorkova S.A.* — study concept and design, editing; *Erokhin P.S.* — conducting research using atomic force microscopy, editing; *Goncharova A.Yu.* — conducting research; *Kravtsov A.L.* — study concept, 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 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 01.02.2024;
accepted for publication 03.04.2024;
published 29.06.2024



Влияние углеводных адъювантов в составе экспериментального хантавирусного вакцинного препарата на динамику нейтрализующих антител в сыворотках крови морских свинок

Курашова С.С.^{1✉}, Егорова М.С.¹, Ветрова А.Н.¹, Баловнева М.В.¹, Попова Ю.В.¹,
Теодорович Р.Д.¹, Мироненко А.А.², Апарин П.Г.², Львов В.Л.²,
Ткаченко Е.А.¹, Дзагурова Т.К.¹

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

²Государственный научный центр «Институт иммунологии», Москва, Россия

Аннотация

Введение. Вакцинация могла бы стать наиболее эффективным способом контроля геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), которая занимает ведущее место среди зоонозов и одно из первых мест среди природно-очаговых заболеваний человека. В связи с этим актуальны разработка эффективного вакцинного препарата, а также поиск новых нетоксичных и эффективных адъювантов, которые могут способствовать усилению и пролонгированию иммунного ответа, снижению концентрации антигена и уменьшению кратности введения препаратов.

Цель исследования — определить зависимость иммуногенной активности экспериментального хантавирусного препарата на основе вируса Пуумала (ХП) от дозы антигена как в нативном виде, так и в сочетании с углеводными адъювантами.

Материалы и методы. Исследован иммуноадъювантный эффект Ас3-ЛПС *Shigella sonnei* и *S. flexneri* 1В и эмульсии наноэмульгированного сквалена Sepivac SWE (SWE) в составе ХП в оптимальной и минимальной дозах по индукции нейтрализующих антител после 3-кратной иммунизации (0, 14, 182-й день) морских свинок (*Cavia porcellus*). Различия в иммуногенной активности ХП оценивали в реакции нейтрализации по 50% подавлению фокусобразующих единиц в культуре клеток Vero E6.

Результаты. Статистически значимое повышение уровня нейтрализующих антител отмечали уже после 1 иммунизации как для ХП в оптимальной дозе, так и для его комбинации с адъювантами. Наиболее выраженный иммуноадъювантный эффект проявили Ас3-ЛПС *S. sonnei* и SWE, в концентрации 50 и 100 мкг/дозу соответственно. Иммуноадъювантный эффект, обусловленный комбинацией ХП с Ас3-ЛПС *S. sonnei* и SWE, способствовал как усилению иммунного ответа, так и его продолжительности. Уменьшение дозы антигена в 10 раз в присутствии SWE позволяет оптимизировать иммунный ответ для вакцинного препарата.

Вывод. Результаты исследования показали перспективность использования Ас3-ЛПС *S. sonnei* и Sepivac SWE в вакцине для профилактики ГЛПС.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, вирус Пуумала, хантавирусный вакцинный препарат, адъюванты, схема введения, нейтрализующие антитела, иммунный ответ

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 ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (протокол № 100622-5 от 10.06.2022).

Благодарность. Выражаем благодарность к.х.н. Л. Каримовой, директору по развитию бизнеса в России и странах СНГ компании «Serpic», за предоставление адъюванта Sepivac SWE для исследований.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования. Работа выполнена в рамках Госзадания № 122041800054-7, на базе Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).

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

Для цитирования: Курашова С.С., Егорова М.С., Ветрова А.Н., Баловнева М.В., Попова Ю.В., Теодорович Р.Д., Мироненко А.А., Апарин П.Г., Львов В.Л., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Влияние углеводных адъювантов в составе экспериментального хантавирусного вакцинного препарата на динамику нейтрализующих антител в сыворотках крови морских свинок. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):383–392. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-523>
EDN: <https://www.elibrary.ru/kjcoua>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-523>

The effect of carbohydrate adjuvants in the composition of the experimental hantavirus vaccine on the dynamics of neutralizing antibodies in the blood sera of guinea pigs

Svetlana S. Kurashova^{1✉}, Maria S. Egorova¹, Anna N. Vetrova¹, Maria V. Balovneva¹, Yulia V. Popova¹, Rostislav D. Teodorovich¹, Anna A. Mironenko², Peter G. Aparin², Vyatcheslav L. Lvov², Evgeniy A. Tkachenko¹, Tamara K. Dzagurova¹

¹M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs (Polio Institute), Moscow, Russia;

²National Research Center Institute of Immunology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Vaccination could be the most effective means of preventing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), which is one of the leading zoonoses and a major cause of natural disease in humans. Therefore, research to develop an effective vaccine and the search for new non-toxic and effective adjuvants that can enhance and prolong the immune response, reduce the antigen concentration and reduce the frequency of dose administration is an urgent task.

The aim of the study was to determine the dependence of the immunogenic activity of an experimental hantavirus vaccine based on Puumala virus (HV) on the antigen dose both in native form and in combination with carbohydrate adjuvants.

Materials and methods. The immunoadjuvant effect of Ac3-LPS *S. sonnei* and *S. flexneri 1B* and emulsions of nanoemulsified squalene Sepivac SWE (SWE) as part of HV at the optimal and minimal doses was investigated by induction of neutralising antibodies after 3-fold immunisation (day 0, 14, 182) of guinea pigs (*Cavia porcellus*). Differences in the immunogenic activity of HV were assessed in the neutralisation reaction by 50% suppression of focal units in Vero E6 cell cultures.

Results. A statistically significant increase in neutralising antibodies levels was observed after immunization both with HV at the optimal dose and for its combination with adjuvants. Ac3-LPS *S. sonnei* and SWE showed the most pronounced immunoadjuvant effect at concentrations of 50 and 100 µg/dose, respectively. The immunoadjuvant effect of the combination of the hantavirus vaccine with Ac3-LPS *S. sonnei* and SWE contributed to both an enhanced immune response and its duration. The tenfold reduction of the antigen dose in the presence of SWE allows optimization of the immune response to the vaccine.

Conclusion. The results of this study show the prospects of using Ac3-LPS *S. sonnei* and Sepivac SWE in the vaccine for the prevention of HFRS.

Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome, Puumala virus, hantavirus vaccine, adjuvants, administration scheme, neutralizing antibodies, immune response.

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 M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs (Polio Institute) (protocol No. 100622-5, June 10, 2022).

Acknowledgement. We express our gratitude to L. Karimova, Cand. Sci. (Chem.), Director of business development in Russia and the CIS countries of Seppic, for providing the Sepivac SWE adjuvant for research.

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: Kurashova S.S., Egorova M.S., Vetrova A.N., Balovneva M.V., Popova Yu.V., Teodorovich R.D., Mironenko A.A., Aparin P.G., Lvov V.L., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. The effect of carbohydrate adjuvants in the composition of the experimental hantavirus vaccine on the dynamics of neutralizing antibodies in the blood sera of guinea pigs. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):383–392.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-523>

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

Введение

Основную роль в структуре заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) играет вирус Пуумала, на долю которого приходится 97,7% случаев заболеваний ГЛПС в России, а на долю вирусов Хантаан, Сеул, Амур и двух подтипов (Куркино и Сочи) вируса Добrava/Белград — менее 3% [1]. Такая эпидемиологическая обстановка на территории России представляет собой серьёзную угрозу населению. Ввиду отсутствия этиотропного лечения ГЛПС актуальна разработка вакцинного препарата для её профилактики [2].

Этап лицензирования прошли 6 хантавирусных вакцин: 3 культуральных и одна мозговая в Китае и по одной мозговой вакцине в КНДР и Южной Корее, которые производятся на основе хантавирусов Хантаан или Сеул. Ни одна из этих вакцин не может применяться в европейских регионах России, поскольку не обладает защитным действием против вируса Пуумала — основного возбудителя ГЛПС на этой территории [3]. В России разработка технологии изготовления инактивированных формалином или бета-пропиолактоном цельновирионных вакцинных препаратов на перевиваемой линии клеток Vero началась в 1990 г., когда удалось оптимизировать получение высокотитражного урожая вируса Пуумала [4]. Успешно прошли доклинические исследования 3 кандидатных вакцинных препарата: моновакцина с использованием вируса Пуумала «PUUVAX» в 1990 г. [4], двухкомпонентная вакцина «Комби-ГЛПС-Вак» на основе вирусов Пуумала и Добrava/Белград (подтип Куркино) в 2008 г. [5], трёхкомпонентная вакцина «ГЛПС-Вак» на основе вирусов Пуумала, Добrava/Белград (подтип Сочи) и Хантаан в 2018 г. [6].

Иммуногенную активность и протективность инактивированных цельновирионных вакцинных препаратов для профилактики различных инфекций можно повысить с помощью адъювантов, которые способствуют пролонгированию иммунного ответа, снижению концентрации антигена и уменьшению кратности введения препаратов, обеспечивая рациональное соотношение доза–ответ [7, 8]. Вакцинный препарат для профилактики ГЛПС не является исключением. Ранее в рамках доклинических исследований мы оценивали возможное влияние различных групп адъювантов на повышение иммуногенной активности моновалентного и поливалентного вакцинных препаратов для профилактики ГЛПС в ответ на их введение мышам BALB/c [9]. Установлены наибольшая эффективность и целесообразность применения группы углеводных адъювантов на примере низкоэндогенного апириногенного липополисахарида (ЛПС), содержащего триацильные производные липида А — Ac3-ЛПС *Shigella sonnei*, в вакцинном препарате для профилактики ГЛПС [10]. Также на мышах линии BALB/c и мор-

ских свинках были установлены оптимальная и минимальная иммунизирующие дозы хантавирусного вакцинного препарата (ХП) [9, 11]. Для решения вопроса о влиянии адъювантов на силу и длительность иммунного ответа в данном исследовании в качестве модели экспериментальных животных были выбраны морские свинки *Cavia porcellus*.

Адъюванты характеризуются большим разнообразием, поэтому подбор осуществляется путём сравнения их эффективности на моделях животных, а также оценки их безопасности и переносимости [12]. Они способны усиливать формирование иммунного ответа, генерируя долговременную Т- и В-клеточную память [13], определять конкретный тип иммунного ответа, который может быть смещён в сторону ответов цитотоксических Т-клеток, определённых классов Т-хелперов и изотипов антител [14]. Врождённая иммунная система может распознавать патогены напрямую через различные образ-распознающие рецепторы, среди которых наиболее важными являются Toll-подобные рецепторы (TLR) [15, 16]. Они экспрессируются на дендритных, эндотелиальных и тучных клетках, макрофагах, нейтрофилах и т. д. и обладают широкой специфичностью в отношении консервативных молекулярных паттернов патогенов [17]. Традиционно применяемые адъюванты на основе алюминия и MF59 малоэффективны и не оказывают заметного воздействия на клеточный иммунный ответ [18]. В последнее время особое внимание стали уделять адъювантам на основе углеводов [12], которые безопасны, биосовместимы и способны стимулировать сильные и длительные гуморальные и клеточные иммунные реакции [19] через TLR [20, 21], нуклеотид-связывающие домены олигомеризации, содержащие белок 2 [22], С-типа лектины [23] или CD1d-зависимые естественные киллеры [24], которые впоследствии стимулируют продукцию цитокинов [25]. Было показано, что монофосфорилипид А, являясь нетоксичным компонентом ЛПС [26] и вместе с тем единственным агонистом TLR4 [27], одобрен в качестве адъюванта в вакцинах для лечения рака, аллергии и инфекционных болезней [28]. Другой углеводный адъювант — глюкопираниозиллипид А — в доклинических исследованиях индуцировал выработку цитокинов в составе вакцинных препаратов за счёт стимуляции иммунных клеток [29]. Углеводные адъюванты растительного происхождения могут осуществлять доставку антигена к антигенпрезентирующим клеткам [30], являясь агонистами TLR4 [27] или усилителями иммунного ответа [31]. Эти сигнальные каскады в конечном итоге генерируют антигенспецифические Т- и В-клеточные реакции, которые алюминий не может индуцировать [32], что сделало их пригодными для разработки вакцинных препаратов, в том числе против вирусов ветряной оспы, иммунодефицита человека, папилломы человека и гепатита В [33].

Безопасность и клиническая применимость Ас3-ЛПС как класса молекул показана в клинических исследованиях кандидатной дизентерийной вакцины против *Shigella flexneri* «Флексвак» на основе Ас3-ЛПС *S. flexneri* 2a [34]. В исследованиях иммуногенной активности вакцины против гриппа H7N9 добавление адьюванта Sepivac SWE (SWE; эмульсия сквалена в воде) усиливало функциональные реакции антител у хорьков, а также позволяло снижать дозу антигена по меньшей мере в 6 раз [35]. В составе белковых субъединичных вакцин против COVID-19 адьювант SWE на модели мышей BALB/c позволял сократить количество доз, способствовал увеличению количества нейтрализующих антител (нАТ) и индуцировал сбалансированные иммунные ответы Th1/Th2 по сравнению с гидроксидом алюминия [36]. SWE-адьювантная вакцина против COVID-19 COVAC-2 вышла на клинические испытания NCT04702178¹ и NCT05209009².

Целью данного исследования являлось определение эффективности углеводных адьювантов различного происхождения в составе экспериментального ХП на основе вируса Пуумала на модели морских свинок.

Материалы и методы

Использовали культуры клеток Vero (ATCC CCL-81) — перевиваемая культура клеток почки зелёной марышки, Vero-E6 (ATCCNo. CRL-1586) — клон Vero C1008 культуры VERO.

Вирус Пуумала, штамм PUU-TKD-VERO, депонирован в Государственной коллекции вирусов (Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ) под номером № 1026. Полногеномные сиквенсы штамма PUU-TKD-VERO зарегистрированы в GenBank под номерами: S — MN251331, M — MN251332, L — MN251333.

Для выявления и титрования хантавирусов в культуре клеток Vero E6 применяли метод фокус-образующих единиц (ФОЕ) [37]. Вируснейтрализующие антитела (нАТ) выявляли по подавлению ФОЕ в культуре клеток Vero E6 в реакции нейтрализации [38]. За титр нАТ принимали разведение сыворотки, подавляющее 50% ФОЕ (РН/ФОЕ₅₀), выявленных в контрольном образце вируса. Каждая проба сыворотки крови трижды исследована в РН/ФОЕ₅₀.

Получение экспериментального хантавирусного препарата

Для исследований сравнительной эффективности адьювантов готовили полуфабрикаты ХП,

используя вирус Пуумала [6, 38]. После хроматографической очистки первичного концентрата вируса Пуумала на мультимодальном сорбенте «Capto Core 700» («GE Healthcare») титр вируса до инаktivации составлял $5,0 \pm 0,4$ lg ФОЕ/мл, $2,32 \times 10^6 \pm 98$ копий вирусной РНК/мл, общий белок 30 ± 6 мкг/мл. Выделение РНК и определение количества копий РНК/мл методом ПЦР в реальном времени описаны ранее [39]. Этап инаktivации проводили бета-пропиолактоном в конечном разведении 1 : 6000 при комнатной температуре в течение 1 ч на мешалке [40]. Оптимальной дозе ХП соответствовало содержание вируса $4,5 \pm 0,3$ lg ФОЕ/мл ($1 \times 10^4 \pm 98$ копий вирусной РНК/мл) и общего белка 20 ± 6 мкг/мл, а за минимальную дозу принимали ХП, разведённый физиологическим раствором в 10 раз [9].

Инаktivированный препарат хранили при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Остаточную инфекционность ХП определяли по описанной методике [40]. При отсутствии инфекционности после 5 последовательных пассажей в культуре клеток Vero приступали к контролю иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов.

Эксперименты с использованием инфекционных материалов проводили в лаборатории, оборудованной специальным блоком для работы с вирусами 2-й группы патогенности, на работу с которыми имеется разрешение Роспотребнадзора.

Адьюванты

Варианты низкоэндогенных ЛПС рода *Shigella* для исследования влияния на иммуногенную активность в составе ХП, полученные в ГНЦ «Институт иммунологии» [11, 34]:

1) низкоэндогенный апиогенный ЛПС, содержащий гомогенные длинные О-полисахаридные домены Ас3-ЛПС *S. sonnei* (ЛПСГ-*S. sonnei*, 50 мкг/дозу);

2) низкоэндогенный апиогенный ЛПС, содержащий смесь коротких и длинных О-полисахаридных доменов Ас3-ЛПС *S. sonnei* (ЛПС-*S. sonnei*, 50 мкг/дозу);

3) гомогенный низкоэндогенный апиогенный ЛПС, содержащий гомогенные длинные О-полисахаридные домены Ас3-ЛПС *S. flexneri* 1В (ЛПС-*S. flexneri*, 50 мкг/дозу).

Эмульсия наноэмульгированного сквалена животного происхождения по типу «масло в воде» (аналог MF-59) SEPIVAC SWE (SWE, в концентрации 100 мкг/дозу³) была безвозмездно передана компанией «Seppic» для проведения данных исследований.

¹ A Clinical trial of COVAC-2 in healthy adults.
URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04702178>

² A Clinical trial of COVAC-2 in adults.
URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05209009>

³ SEPIVAC SWE.
URL: <https://www.seppic.com/en/sepivac-swe-pharma>

Иммунизация животных

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены рандомизированно на группы. Исследования выполняли на самках аутбредных морских свинок Hartley массой 290–330 г ($n = 6$), поставляемых филиалом «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), и правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 19.06.2003 № 267). Одобрение исследования подтверждается выпиской из протокола этического комитета ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита) от 10.06.2022 № 100622-5.

К ХП с оптимальной и минимальной концентрациями антигена добавляли адьюванты. Животным контрольных групп вводили физиологический раствор в том же объеме и с соответствующей концентрацией адьюванта, что и экспериментальным.

Животных экспериментальных групп (ХП, ХП-ЛПСГ-*S. sonnei*, ХП-ЛПС-*S. sonnei*, ХП-ЛПС-*S. flexneri*, ХП-SWE) иммунизировали антигеном в оптимальной или сниженной в 10 раз концентрации.

Животным опытных групп вводили исследуемый препарат в дозе 0,3 мл трёхкратно внутримышечно (0, 14, 182 дня). Проведены 3 серии экспериментов в идентичных дозах. Забор крови у морских свинок проводили каждые 14 дней от начала эксперимента пункцией сердца в течение года.

Сыворотки крови морских свинок прогревали при 56°C в течение 30 мин и хранили до исследования при $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

Статистический анализ

Минимальный объем выборки рассчитывали при помощи базовой функции *power.t.test* для уровня статистической значимости не менее 95%. Результаты экспериментов (совокупные данные 3 независимых опытов) были проанализированы, сгенерированы и графически представлены в программном обеспечении «GraphPad Prism v. 9.4.0». Уровень значимости различий между несколькими группами определяли с использованием непараметрического метода трёхстороннего дисперсионного анализа ANOVA с тестом множественного сравнения Тьюки. Иммуногенную активность выражали в виде среднегеометрических значений титра нАТ в двоичных логарифмах \pm стандартное отклонение. Статистически значимыми принимали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты

Титры антител у животных до начала иммунизации во всех группах были отрицательными, а в группах отрицательного контроля оставались отрицательными (титры нАТ ≤ 4) в течение всего эксперимента. Средние геометрические титры нАТ, вырабатываемых в ответ на различные комбинации вакцины против Пуумала с адьювантами и без, приведены на **рис. 1–4**. Группами сравнения являлись ХП и ХП-1/10. Сравнение титров нАТ проводили между ними и другими группами, иммунизированными ХП с добавлением различных адьювантов в соответствующий день отбора сыворотки крови. В экспериментальных группах нАТ определялись через 14 дней после 1-й иммунизации у всех животных. Анализ динамики нарастания титра нАТ в сыворотках крови морских свинок в экспериментальных группах продемонстрировал существенные различия. Первичный ответ выражался в повышении уровня нАТ в сыворотках крови уже после

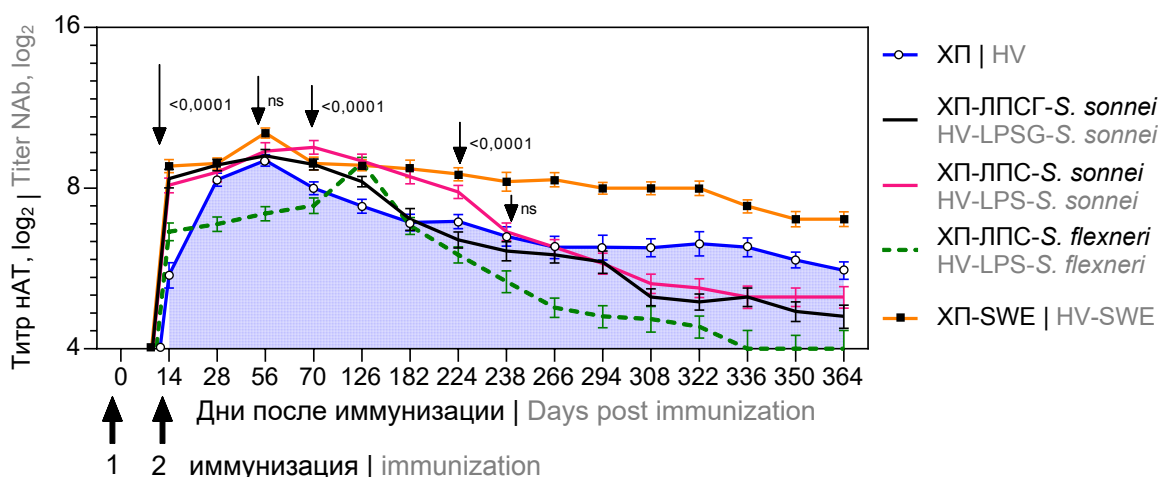


Рис. 1. Кинетика титра нАТ в сыворотках крови морских свинок в ответ на двукратное введение ХП в оптимальной дозе.

Fig. 1. Kinetics of neutralizing antibody titers in guinea pig blood sera in response to two doses of HV administered at optimal dosage.

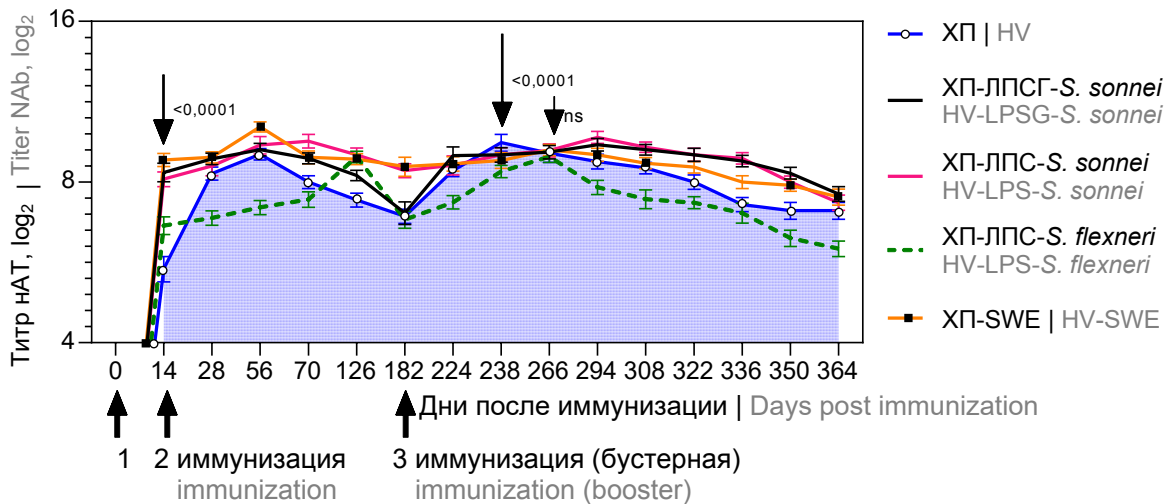


Рис. 2. Кинетика титра нАТ в сыворотках крови морских свинок в ответ на трёхкратное введение ХП.

Fig. 2. Kinetics of neutralizing antibody titers in guinea pig blood sera in response to three doses of the HV.

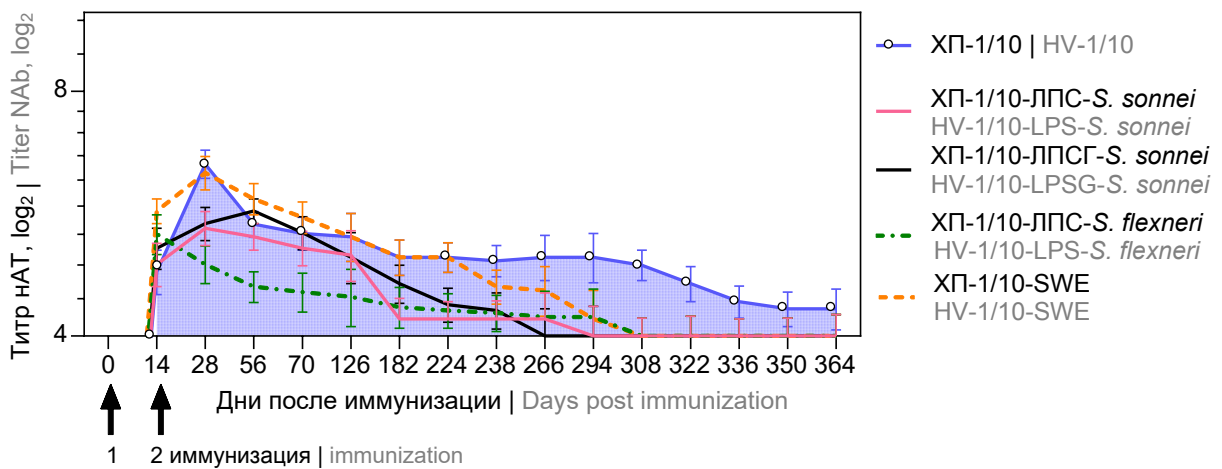


Рис. 3. Кинетика титра нАТ в сыворотках крови морских свинок в ответ на двукратное введение минимальной дозы антигена в ХП.

Fig. 3. Kinetics of neutralizing antibody titers in guinea pig blood sera in response to two doses of HV administered at minimal dosage.

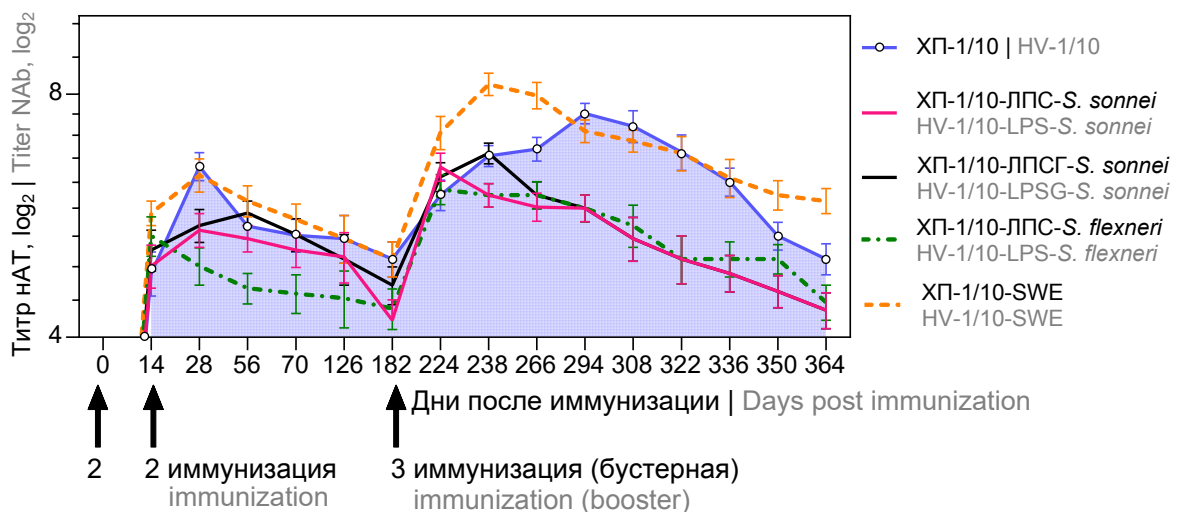


Рис. 4. Кинетика титра нАТ в сыворотках крови морских свинок в ответ на бустерное введение минимальной дозы иммуногена в составе ХП.

Fig. 4. Kinetics of neutralizing antibody titers in guinea pig blood sera in response to booster administration of HV at a minimal dose.

1-й иммунизации во всех группах по сравнению с контролем. Пиковые значения для разных групп наблюдали в разные дни: на 56-й день — для ХП ($9,0 \pm 0,2 \log_2$), ХП-ЛПС-*S. sonnei* ($9,2 \pm 0,25 \log_2$), ХП-SWE ($10,15 \pm 0,22 \log_2$), на 70-й день — ХП-ЛПСГ-*S. sonnei* ($9,54 \pm 0,28 \log_2$), на 126-й день — ХП-ЛПС-*S. flexneri* ($8,92 \pm 0,22 \log_2$).

Для ХП-ЛПСГ-*S. sonnei* и ХП-ЛПС-*S. sonnei* наблюдали плавное снижение титров нАТ ниже такового для ХП. К 364-му дню титр нАТ составлял $4,6 \pm 0,2$; $5,00 \pm 0,23$ и $5,6 \pm 0,21 \log_2$ соответственно. В группе ХП-ЛПС-*S. flexneri* наблюдали более стремительное снижение титров нАТ, достигшее порога отсечения на 336-й день. В присутствии SWE наблюдали крайне медленное снижение титров нАТ. На 364-й день титр нАТ оставался на уровне $7,0 \pm 0,2 \log_2$. В сыворотках крови всех экспериментальных морских свинок к 364-му дню после двукратной иммунизации сохранялись нАТ.

На фоне снижения нАТ в сыворотках крови морских свинок бустерное введение препарата на 182-й день от начала иммунизации приводило к формированию аналогичного профиля нАТ для всех исследуемых групп (рис. 2). Нарастание до пиковых значений наблюдали: к 238-му дню для ХП ($9,48 \pm 0,3 \log_2$), на 266-й день — ХП-ЛПС-*S. flexneri* ($8,92 \pm 0,2 \log_2$) и ХП-SWE ($9,19 \pm 0,22 \log_2$), на 294-й день — ХП-ЛПСГ-*S. sonnei* ($9,4 \pm 0,25 \log_2$) и ХП-ЛПС-*S. sonnei* ($9,7 \pm 0,25 \log_2$), с последующим плавным снижением.

При этом уменьшение концентрации иммуногена в ХП в 10 раз индуцировало аналогичную динамику нарастания титра нАТ пропорционально вводимой дозе, но иммуномодулирующая эффективность адьювантов в таких условиях также была различна (рис. 3). Пиковые значения для разных групп наблюдали в разные дни: на 14-й день — для ХП-1/10-ЛПС-*S. flexneri* ($5,34 \pm 0,3 \log_2$), на 28-й — ХП-1/10 ($6,50 \pm 0,26 \log_2$), ХП-1/10-ЛПС-*S. sonnei* ($5,43 \pm 0,26 \log_2$) и ХП-1/10-SWE ($6,35 \pm 0,30 \log_2$), на 56-й — ХП-1/10-ЛПСГ-*S. sonnei* ($5,7 \pm 0,2 \log_2$). Снижение уровня нАТ в сыворотках крови ниже порога отсечения наблюдали на 266-й день для ХП-1/10-ЛПСГ-*S. sonnei* ($4,00 \pm 0,2 \log_2$), на 294-й — ХП-1/10-ЛПС-*S. sonnei* ($4,0 \pm 0,2 \log_2$), на 308-й — ХП-1/10-ЛПС-*S. flexneri* ($4,0 \pm 0,2 \log_2$) и ХП-1/10-SWE ($4,0 \pm 0,2 \log_2$), на 364-й — ХП ($4,32 \pm 0,25 \log_2$).

Бустерная иммунизация этими же препаратами через 182 дня приводила к пиковым значениям нАТ в сыворотках крови морских свинок: на 224-й день для ХП-1/10-ЛПС-*S. sonnei* ($6,50 \pm 0,26 \log_2$) и ХП-1/10-ЛПС-*S. flexneri* ($6,1 \pm 0,3 \log_2$), на 238-й — ХП-1/10-ЛПСГ-*S. sonnei* ($6,76 \pm 0,2 \log_2$), на 294-й — ХП-1/10 ($7,57 \pm 0,20 \log_2$) и ХП-1/10-SWE ($8,23 \pm 0,26 \log_2$) (рис. 4). После максимальных значений титра нАТ наблюдали их плавное снижение к 364-му дню (выше порога отсечения).

Обсуждение

Впервые рассмотрена эффективность адьювантов в составе экспериментального ХП на основе вируса Пуумала на морских свинках, которые часто используются в качестве модели для ряда инфекционных заболеваний человека из-за сходства индукции иммунного ответа [40].

Анализ динамики продуцирования нАТ в экспериментальных группах показал существенное различие степени их иммуногенной активности в зависимости от комбинации ХП с адьювантом. Подобные результаты мы наблюдали в наших предыдущих экспериментах на модели BALB/c, когда была установлена индукция гуморального и клеточного иммунного ответа для нативного ХП и его комбинации с адьювантами различного происхождения [9]. Однако модель морских свинок позволила подтвердить формирование иммунологической памяти и выявить существенные различия в нарастании титров нАТ для разных экспериментальных групп, несмотря на одинаковую схему иммунизации. В целом наблюдалась схожая динамика титров нАТ после иммунизации ХП как в оптимальной, так и в сниженной в 10 раз концентрации антигена [11]. Выраженный для обоих вариантов бустерный эффект характеризовался более высоким уровнем нАТ в сыворотках крови экспериментальных животных, что подтверждает эффективность иммунизации и позволяет судить о возможности применения сниженной дозы антигена для определённых групп граждан [11]. Стоит отметить, что в данном исследовании важным критерием эффективной иммунизации было определение влияния бустерной иммунизации ХП в комбинации с углеводными адьювантами через 182 дня после 1-й иммунизации, особенно для минимальных доз иммуногена, что может значительно увеличивать доступность вакцины в условиях эпидемиологических вспышек.

Для низкоэндогенного апириногенного ЛПС рода *Shigella*, использованного в качестве адьюванта, наблюдали различную картину в динамике нарастания нАТ. ХП-ЛПСГ-*S. sonnei* и ХП-ЛПС-*S. sonnei* в концентрациях 50 мкг/дозу индуцировали ранний гуморальный иммунный ответ, с формированием «плато» нАТ с высоким титром с 14-го по 126-й день после 1-й иммунизации. Для ХП-ЛПСГ-*S. sonnei* отмечалось значительное пролонгирование индукции нАТ до 224-го дня с менее выраженным подъёмом после бустерного введения на 294-й день, как и для ХП-ЛПС-*S. sonnei*. Такой эффект можно связать с избыточной стимуляцией иммунной системы и для уменьшения подобного воздействия целесообразно увеличить интервал для бустерной иммунизации до 1 года либо снизить концентрацию антигена в вакцинном препарате. Таким образом, иммуноадьювантный эффект ЛПСГ-*S. sonnei* заключается в пролонгировании гу-

морального иммунного ответа, что позволит увеличить интервалы в схеме иммунизации. Безусловно, низкоэндогенные апиригенные Ас3-ЛПС являются многообещающими адъювантами с подтвержденным в клинических исследованиях отсутствием стимуляции продукции провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерлекинов-1 β и -6), системных и местных эндогенных побочных реакций при парентеральном введении добровольцам в дозе 50 мкг [34]. Данные нашего исследования показали существенный подъем титра нАТ в ответ на бустерную иммунизацию препаратом, содержащим в 10 раз меньше антигена в комбинации с тремя ЛПС, однако титр нАТ не поднимался в сыворотках крови морских свинок статистически значимо выше, чем при введении ХП-1/10. Таким образом, наиболее выраженный иммуноадъювантный эффект ЛПС заключался в пролонгировании индукции нАТ при оптимальной дозе антигена.

Менее выраженный иммунный ответ ХП-ЛПС-*S. flexneri* в концентрации 50 мкг/дозу выражался в более отдаленном формировании пика нАТ (к 126-му дню) в сравнении с ХП (на 56-й день). Для ХП-ЛПС-*S. flexneri* первичный ответ выражался в более значительном повышении уровня нАТ в сыворотке крови морских свинок по сравнению с нативным ХП после первой иммунизации. Бустерное введение препарата приводило к повышению уровня нАТ с формированием повторного пика на 266-й день.

Для SWE в концентрации 100 мкг/дозу наблюдали наиболее выраженный иммуноадъювантный эффект. Однако из-за избыточной стимуляции иммунной системы бустерное введение препарата на 182-й день не приводило к ожидаемому подъему уровня нАТ в сыворотках крови морских свинок. Вероятно, увеличение интервала в схеме иммунизации позволило бы компенсировать нагрузку на иммунную систему. Наиболее выраженный иммунный ответ был получен в ответ на ХП-1/10-SWE. Это подтверждает теорию об усилении иммунного ответа за счёт оптимального соотношения антиген : адъювант [11]. Для адъюванта Sepivac SWE в концентрации 100 мкг/дозу показана иммунологическая и экономическая целесообразность применения низких доз антигена. Подобная комбинация на фоне усиления антигенспецифических иммунных реакций и формирования иммунологической памяти позволяет уменьшить оптимальную дозу антигена и/или количество инъекций.

Заключение

Результаты свидетельствуют о раннем формировании иммунного ответа, интенсивность которого зависела от дозы вводимого иммуногена и комбинации с адъювантами. Наблюдаемые закономерности при иммунизации оптимальными и сниженными

в 10 раз концентрациями антигена в ответ на бустерное введение обосновывают целесообразность меньших доз или увеличение интервалов между бустерными инъекциями во избежание избыточной стимуляции иммунной системы, что было показано нами ранее [11]. Обобщая результаты исследования, можно сделать вывод о том, что наиболее перспективными в составе ХП против ГЛПС можно рассматривать низкоэндогенный апиригенный Ас3-ЛПС *S. sonnei*, содержащий гомогенные длинные О-полисахаридные домены, и эмульсию наноэмульгированного сквалена животного происхождения по типу «масло в воде» (аналог MF59) Sepivac SWE в концентрациях 50 и 100 мкг/дозу соответственно.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019;25(12):2325–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
2. Tkachenko E., Kurashova S., Balkina A., et al. Cases of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia during 2000–2022. *Viruses.* 2023;15(7):1537. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15071537>
3. Дзагурова Т.К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: этиология, специфическая лабораторная диагностика, разработка диагностических и вакцинных препаратов: Дисс. ... д-ра мед. наук. М.:2014. Dzagurova T.K. Hemorrhagic fever with renal syndrome: etiology, specific laboratory diagnostics, development of diagnostic and vaccine preparations: Diss. Moscow;2014.
4. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Набатников П.А. и др. Разработка экспериментальной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Медицинская вирусология.* 2009;26:194–6. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Nabatnikov P.A., et al. Development of an experimental vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Medical Virology.* 2009;26:194–6.
5. Бархалёва О.А., Воробьёва М.С., Ладыженская И.П. и др. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2011;(1):27–30. Barkhaleva O.A., Vorobieva M.S., Ladyzhenskaya I.P., et al. Vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2011;(1):27–30. EDN: <https://elibrary.ru/rdtech>
6. Dzagurova T.K., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A., et al. Pre-clinical studies of inactivated polyvalent HFRS vaccine. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10:545372. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.545372>
7. Kaech S.M., Wherry E.J., Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2(4):251–62. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri778>
8. Plotkin S.A. Vaccines: past, present and future. *Nat. Med.* 2005;11(4 Suppl.):S5–11. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1209>
9. Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., et al. Various adjuvants effect on immunogenicity of Puumala virus vaccine. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10:545371. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.545371>
10. Курашова С.С., Дзагурова Т.К., Егорова М.С. и др. Влияние адъювантов различных групп на иммуногенные свойства кандидатных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Биотехнология.* 2020;36(2):74–85. Kurashova S.S., Dzagurova T.K., Egorova M.S., et al. The

- effect of adjuvants of different groups on the immunogenicity of vaccines against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Biotechnology in Russia*. 2020;36(2):74–85. DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-2-74-85> EDN: <https://elibrary.ru/lthwli>
11. Курашова С.С., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А., и др. Гуморальный иммунный ответ после иммунизации морских свинок вакцинным препаратом на основе вируса Пуумала. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(5):971–5. Kurashova S.S., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A., et al. Immune response evaluation in the guinea pigs after immunization with the experimental Puumala virus vaccine. *Russian Journal of Infection and Immunity*. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-IRE-1956> EDN: <https://elibrary.ru/avumst>
 12. Курашова С.С., Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А. и др. Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(2): 81–91. Kurashova S.S., Dzagurova T.K., Ishmukhametov A.A., et al. Carbohydrate-based adjuvants for vaccine production. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(2): 81–91. DOI: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91> EDN: <https://elibrary.ru/xqrejv>
 13. Pulendran B., Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*. 2006;124(4):849–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.019>
 14. Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol. Rev*. 2004;199:227–50. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00144.x>
 15. Germain R.N. An innately interesting decade of research in immunology. *Nat. Med*. 2004;10(12):1307–20. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1159>
 16. Janeway Jr. C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol*. 2002;20(1):197–216. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
 17. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430(6996):257–63. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02761>
 18. Savelkoul H.F.J. et al. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2015; 3(1):148–71. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines3010148>
 19. Garcia-Vello P., Speciale I., Chiodo F., et al. Carbohydrate-based adjuvants. *Drug Discov. Today: Technol*. 2020;35-36:57–68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2020.09.005>
 20. Di Lorenzo F., De Castro C., Silipo A., et al. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiol. Rev*. 2019;43(3):257–72. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz002>
 21. Jin J.W., Tang S.Q., Rong M.Z., et al. Synergistic effect of dual targeting vaccine adjuvant with aminated β -glucan and CpG-oligodeoxynucleotides for both humoral and cellular immune responses. *Acta Biomater*. 2018;78:211–23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.002>
 22. Pazos M., Peters K. Peptidoglycan. *Subcell. Biochem*. 2019;92:127–68. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_5
 23. Stocker B.L., Kodar K., Wahi K., et al. The effects of trehalose glycolipid presentation on cytokine production by GM-CSF macrophages. *Glycoconj. J*. 2019;36(1):69–78. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10719-018-09857-9>
 24. Clark K., Yau J., Bloom A., et al. Structure-function implications of the ability of monoclonal antibodies against α -galactosylceramide-CD1d complex to recognize β -mannosylceramide presentation by CD1d. *Front. Immunol*. 2019;10:2355. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02355>
 25. Longet S., Abautret-Daly A., Davitt C.J.H., et al. An oral alpha-galactosylceramide adjuvanted Helicobacter pylori vaccine induces protective IL-1R- and IL-17R-dependent Th1 responses. *NPJ Vaccines*. 2019;4:45. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0139-z>
 26. Pirahmadi S., Zakeri S., Mehrizi A.A., et al. Combining monophosphoryl lipid a (MPL), CpG oligodeoxynucleotide (ODN), and QS-21 adjuvants induces strong and persistent functional antibodies and T cell responses against cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CeTOS) of *Plasmodium falciparum* in BALB/c mice. *Infection Immun*. 2019;87(6): e00911-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00911-18>
 27. Fox C.B., Friede M., Reed G.S., Ireton G.C. Synthetic and natural TLR4 agonists as safe and effective vaccine adjuvants. *Subcell. Biochem*. 2010;53:303–21. DOI: https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_14
 28. Cluff C.W. Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2010;667:111–23. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1603-7_10
 29. Coler R.N., Bertholet S., Moutaftis M., et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS One*. 2011;6(1):e16333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016333>
 30. Gu P., Liu Z., Sun Y., et al. Angelica sinensis polysaccharide encapsulated into PLGA nanoparticles as a vaccine delivery and adjuvant system for ovalbumin to promote immune responses. *Int. J. Pharm*. 2019;554:72–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.008>
 31. Bobbala S., Gibson B., Gamble A., et al. Poloxamer 407-chitosan grafted thermoresponsive hydrogels achieve synchronous and sustained release of antigen and adjuvant from single-shot vaccines. *Immunol. Cell Biol*. 2018;96(6):656–65. DOI: <https://doi.org/10.1111/imcb.12031>
 32. Jin J.W., Tang M.Z., Ring M.Z., Zhang M.Q. Synergistic effect of dual targeting vaccine adjuvant with aminated β -glucan and CpG-oligodeoxynucleotides for both humoral and cellular immune responses. *Acta Biomater*. 2018;78:211–23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.002>
 33. Taleghani N., Bozorg A., Azimi A., et al. Immunogenicity of HPV and HBV vaccines: adjuvanticity of synthetic analogs of monophosphoryl lipid A combined with aluminum hydroxide. *APMIS*. 2019;127(3):150–7. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12927>
 34. Ledov V.A., Golovina M.E., Markina A.A., et al. Highly homogeneous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*. 2019; 37(8):1062–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.067>
 35. de Jonge J., van Dijken H., de Heij F., et al. H7N9 influenza split vaccine with SWE oil-in-water adjuvant greatly enhances cross-reactive humoral immunity and protection against severe pneumonia in ferrets. *NPJ Vaccines*. 2020;5(1):38. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0187-4>
 36. Xu S., Duan H., An Y., et al. Effect of adjuvanting RBD-dimer-based subunit COVID-19 vaccines with Sepivac SWE™. *Vaccine*. 2023;41(17):2793–803. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.03.035>
 37. Егорова М.С., Курашова С.С., Ишмухаметов А.А. и др. Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Вопросы вирусологии*. 2021;66(1):65–73. Egorova M.S., Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., et al. Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Problems of Virology*. 2021;66(1):65–73. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-30> EDN: <https://elibrary.ru/ntgzwx>
 38. Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Егорова М.С. и др. Сравнительная характеристика инактивирующих агентов

для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Egorova M.S., et al. Comparative characteristics of inactivation agents for HFRS vaccine development. 2018;17(4):26–8.

DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29>

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

39. Perepelov A.V., Shekht M., Liu B., et al. *Shigella flexneri* O-antigens revisited: final elucidation of the O-acetylation

profiles and a survey of the O-antigen structure diversity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012;66(2):201–10.

DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2012.01000.x>

40. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Использование морских свинок в биомедицинских исследованиях. *Международный вестник ветеринарии*. 2018;(1):132–7. Rybakova A.V., Makarova M.N. Using guinea pigs for biomedical research. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2018;(1):132–7. EDN: <https://elibrary.ru/yuucit>

Информация об авторах

Курашова Светлана Сергеевна — к.м.н., в.н.с. лаб. геморрагических лихорадок ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, kurashova_ss@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0001-9934-699X>

Егорова Мария Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. геморрагических лихорадок ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3642-6444>

Ветрова Анна Николаевна — м.н.с. лаб. геморрагических лихорадок ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1143-9732>

Баловнева Мария Владимировна — к.б.н., в.н.с. лаб. геморрагических лихорадок ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2198-7521>

Попова Юлия Валерьевна — н.с. лаб. геморрагических лихорадок ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8231-1018>

Теодорович Ростислав Дмитриевич — н.с. лаб. геморрагических лихорадок ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2117-597X>

Мироненко Анна Александровна — к.б.н., с.н.с. лаб. полисахаридных вакцин ГНЦ Институт иммунологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0006-4809-1433>

Апарин Петр Геннадьевич — д.м.н., зав. лаб. полисахаридных вакцин ГНЦ Институт иммунологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7899-2626>

Львов Вячеслав Леонидович — к.х.н., зав. лаб. препаративной биохимии ГНЦ Институт иммунологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0609-8331>

Ткаченко Евгений Александрович — д.м.н., профессор, рук. научного направления учреждения ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6829-1241>

Дзагурова Тамара Казбековна — д.м.н., зав. лаб. геморрагических лихорадок ФНЦРИП им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6656-1682>

Участие авторов: Дзагурова Т.К., Курашова С.С. — концепция и дизайн исследования; Мироненко А.А., Апарин П.Г., Львов В.Л. — подготовка и передача адъювантов, редактирование текста статьи; Ветрова А.Н., Баловнева М.Б., Попова Ю.В., Теодорович Р.Д. — сбор и обработка материала; Курашова С.С. — анализ и интерпретация результатов исследований; Курашова С.С., Ветрова А.Н. — статистическая обработка; Курашова С.С., Егорова М.С. — написание текста; Дзагурова Т.К. — финальное редактирование статьи; Ткаченко Е.А. — утверждение окончательного варианта статьи; Курашова С.С., Егорова М.С., Дзагурова Т.К. — ответственность за целостность всех частей статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 10.04.2024;
принята к публикации 08.06.2024;
опубликована 29.06.2024

Information about the authors

Svetlana S. Kurashova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of hemorrhagic fevers, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, kurashova_ss@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0001-9934-699X>

Maria S. Egorova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of hemorrhagic fevers, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3642-6444>

Anna N. Vetrova — junior researcher, laboratory assistant, Laboratory of hemorrhagic fevers, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1143-9732>

Maria V. Balovneva — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of hemorrhagic fevers, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2198-7521>

Yulia V. Popova — researcher, Laboratory of hemorrhagic fevers, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8231-1018>

Rostislav D. Teodorovich — researcher, Laboratory of hemorrhagic fevers, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2117-597X>

Anna A. Mironenko — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of polysaccharide vaccines, SSC Institute of Immunology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0006-4809-1433>

Peter G. Aparin — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of polysaccharide vaccines, SSC Institute of Immunology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7899-2626>

Vyacheslav L. Lvov — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of preparative biochemistry, SSC Institute of Immunology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0609-8331>

Evgeniy A. Tkachenko — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Scientific direction, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6829-1241>

Tamara K. Dzagurova — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of hemorrhagic fevers, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6656-1682>

Author contribution: Dzagurova T.K., Kurashova S.S. — concept and design of the study; Mironenko A.A., Aparin P.G., Lvov V.L. — preparation and transfer of adjuvants, editing the text of the article; Vetrova A.N., Balovneva M.B., Popova Yu.V., Teodorovich R.D. — collection and processing of material; Kurashova S.S. — analysis and interpretation of research results; Kurashova S.S., Vetrova A.N. — statistical processing; Kurashova S.S., Egorova M.S. — writing the text; Dzagurova T.K. — final editing of the article; Tkachenko E.A. — approval of the final version of the article; Kurashova S.S., Egorova M.S., Dzagurova T.K. — responsibility for the integrity of all parts of the article. All authors confirm that their authorship meets the criteria of the International Committee of Editors of Medical Journals and have read and approved the final version before publication.

The article was submitted 10.04.2024;
accepted for publication 08.06.2024;
published 29.06.2024



Микробиом больничной среды

Брусина Е.Б.[✉]

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация

Цель обзора — дать краткую характеристику биоразнообразию и структуре микробиома больничной среды на основе молекулярно-генетических методов исследования.

До определённого времени исследования микробиоты больничной среды для целей эпидемиологической диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и их контроля основывались на культуральных методах. Вместе с новыми молекулярно-генетическими технологиями изучения микробиома появилась и возможность применения более широкого диапазона характеристик микробного биоразнообразия. На современном уровне знаний больничная среда может рассматриваться как суперорганизм с собственным микробиомом. Мультиомные технологии, включая метатранскриптомный, метапротеомный и метаболомный подходы, предоставляют подробную информацию о микробной активности в окружающей среде. Установлено, что существует устойчивое ядро больничного микробиома, в котором подавляющее большинство микроорганизмов необходимы для функционирования больничной экосистемы и не относятся к числу микроорганизмов, вызывающих инфекционный процесс у человека. Госпитальный микробиом гомогенен, имеет однородную структуру, в которой несколько таксонов доминируют, а остальные компоненты микробной сети обладают низкой связностью, образующей кластерную топологию. Ключевым видом является таксон, значение которого для поддержания структуры сообщества относительно выше, чем других, и его идентификация имеет первостепенное значение. Из-за малой изученности микробиома больничной среды молекулярно-генетическими технологиями не существует единой точки зрения на степень микробного разнообразия в разных медицинских организациях. Несомненно, что молекулярно-генетические технологии позволят пролить свет на процесс формирования госпитальных штаммов, определить, какие индикаторные детерминанты являются наиболее информативными с точки зрения мониторинга и прогноза эпидемического неблагополучия.

Ключевые слова: инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, больничная среда, микробиом, биоразнообразие

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Брусина Е.Б. Микробиом больничной среды. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2024;101(3):393–398. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-520>
EDN: <https://www.elibrary.ru/lrfrw>

Hospital environment microbiome

Elena B. Brusina[✉]

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract

The aim of the review is to give a brief description of the biodiversity and structure of the hospital environment microbiome based on molecular genetic research methods.

Until a certain time, studies of the hospital environment microbiota for the purposes of epidemiological surveillance and control of healthcare-associated infections (HAIs) were based on routine microbiological identification of clinically relevant bacterial taxa. Discovery of DNA, the development of sequencing technologies, PCR and cloning techniques enabled the investigation of microbial communities using cultivation-independent, DNA and RNA-based approaches. At the current level of knowledge, the hospital environment can be considered as a superorganism with its own microbiome. Multiomic technologies, including meta-transcriptomic, meta-proteomic

and metabolomic approaches, provide detailed information about microbial activity in the environment. Now it has been established that there is a stable core of the hospital microbiome where the vast majority of microorganisms are necessary for the functioning of the hospital ecosystem and are not classified as human pathogens. The hospital microbiome has a homogeneous structure composed by a massive dominance of a few taxa and microbial network with low connectivity forming a clustered topology. A keystone species is a taxon whose importance for maintaining community structure is relatively higher than others and its identification is of paramount importance. Due to the lack of knowledge of the hospital environment microbiome by molecular genetic technologies, there is no single shared point of view on the microbial diversity in different healthcare facilities. But there is no doubt that molecular genetic technologies will shed light on the evolution of hospital strains and determine which indicators are the most informative for monitoring and prognosis of HAIs.

Keywords: *healthcare-associated infections, hospital environment, microbiome, biodiversity*

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

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

For citation: Brusina E.B. Hospital environment microbiome. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):393–398. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-520>
EDN: <https://www.elibrary.ru/lrlfrw>

Введение

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), сопровождают все без исключения медицинские организации в мире и существенно влияют на качество оказания медицинской помощи. Их частота значительно варьирует, и, по разным оценкам, составляет 130–203 эпизода на 1000 пациенто-дней¹. При тяжёлых формах ИСМП летальность может достигать 30% [1] и возрастать в течение года еще на 20% после перенесённого сепсиса [2]. Стоимость лечения пациента в случае осложнения ИСМП увеличивается в 2,7 раза [3].

Частота ИСМП — вариабельный параметр и зависит от множества переменных: мощности медицинской организации, её архитектуры, оборудования, применяемых медицинских технологий, типа отделений, преобладающей патологии и возраста пациентов, их коморбидности, продолжительности госпитализации, системы профилактики и контроля ИСМП и др. Но даже при выраженной неоднородности показателей и влияющих на них детерминант очевидно, что ИСМП продолжают относиться к числу глобальных проблем с тяжёлым бременем в виде этических, медицинских, финансовых и социальных составляющих [4].

Значительная часть событий, определяющих эпидемический процесс ИСМП, происходит в больничной среде. Больничная среда представляет собой сложную, динамичную, уникальную химическую и физическую среду обитания, которая отличается высоким разнообразием микроорганизмов и особыми условиями для их отбора и роста. Её уникальность определяется относительной огра-

ниченностью пространства, в пределах которого циркулируют в популяции ослабленных основным заболеванием, часто иммунодефицитных пациентов госпитальные микроорганизмы; сочетанием естественных и искусственных путей и факторов передачи микроорганизмов; постоянным селективным давлением антимикробных средств [5].

По сравнению с общественными зданиями, многоэтажными и частными домами больничная среда подвергается агрессивному воздействию разнообразных химических веществ (дезинфектантов, антибиотиков, лекарственных препаратов), что приводит к доминированию ассоциированных с человеком бактерий с более высоким компонентом патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [6].

К настоящему моменту установлено, что для популяции госпитальных штаммов патогномичными признаками являются низкий (менее 0,4) коэффициент биоразнообразия и вирулентность. Селекция госпитального штамма (клона) — результат сложных межпопуляционных взаимодействий, адаптации определённого микроорганизма к конкретным больничным условиям, в процессе которой он приобретает свойства, значительно повышающие его конкурентные преимущества. Первичное формирование госпитальных штаммов (клонов) происходит в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Установлено, что эпидемическим потенциалом, необходимым и достаточным для эпидемического распространения в больничной среде и колонизации основных экологических ниш, обладает ограниченный спектр бактерий [5, 7, 8].

Эволюция этиологических и клинических форм ИСМП в значительной мере зависит от уровня развития медицины и её технологий. Исторически она преодолела многовековой путь от чумы и холеры в первых странноприимных домах до современных ИСМП, вызванных ESKAPE-пато-

¹ WHO. Report on the Burden of endemic Health Care-Associated Infection Worldwide;2011. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/report-on-the-burden-of-endemic-health-care-associated-infection-worldwide>

генами [9]. Понимание экологии этого сложного сообщества чрезвычайно важно для эффективной борьбы с ИСМП, т. к. именно эти процессы лежат в основе селекции госпитальных штаммов, обуславливающих не менее 60% ИСМП.

Цель обзора — дать краткую характеристику биоразнообразию и структуре микробиома больничной среды на основе молекулярно-генетических методов исследования.

На современном уровне знаний больничная среда может рассматриваться как суперорганизм с собственным микробиомом [10]. Тип персистирующего микробиома особенно важен, поскольку он напрямую коррелирует с риском заражения ИСМП [11].

Понятие микробиома было впервые сформулировано в 1988 г. J.M. Whipps и соавт. [12]. Микробиом определяется как характерное микробное сообщество, занимающее чётко определённую среду обитания, обладающую отчётливыми физико-химическими свойствами. Микробиом не только относится к вовлечённым микроорганизмам, но и охватывает сферу их деятельности, что приводит к формированию определённых экологических ниш. Микробиом, который образует динамичную и интерактивную микроэкосистему, подверженную изменениям во времени и пространстве, интегрирован в макроэкосистемы, включая эукариотических хозяев, и здесь имеет решающее значение для их функционирования и здоровья [13].

О том, как формируется микробиом медицинской организации и какие факторы влияют на его эволюцию, известно мало [14].

Достоверно установлено, что, в сравнении с микробиомом объектов городской инфраструктуры, микробное разнообразие больничной среды значительно меньше [15].

До определённого времени исследования микробиоты больничной среды для целей эпидемиологической диагностики ИСМП и их контроля основывались на культуральных методах. Однако многочисленные исследования показали случайный характер получаемых при таком подходе результатов и значительную ограниченность, а сам подход был образно характеризован как «поиск иголки в стоге сена». Хотя, безусловно, эти методы дают возможность обнаруживать индикаторные бактерии. При использовании этих методов спектр выделенных микроорганизмов ограничивается теми из них, которые способны расти на выбранных культуральных средах, что не позволяет эффективно охарактеризовать микробное разнообразие абиотических больничных поверхностей [16].

Для мониторинга микробных сообществ в больницах в последние десятилетия используется технология секвенирования 16S рРНК [17, 18].

Технологические достижения в области секвенирования нового поколения и метагеномики измени-

ли возможности изучения микробного разнообразия больничной среды, о чём свидетельствует взрывной рост исследований в области микробной экологии [19]. Появилась беспрецедентная возможность быстрых глобальных исследований микроорганизмов, их таксономического и функционального аннотирования, что особенно важно для эпиднадзора за микроорганизмами, в том числе приобретающими устойчивость к противомикробным препаратам [20, 21].

Вместе с новыми молекулярно-генетическими технологиями изучения микробиома появилась и возможность применения более широкого диапазона характеристик микробного биоразнообразия. Существует более 40 различных индексов биоразнообразия, широко применяемых в биологии, некоторые из них пригодны для характеристики биоразнообразия микробиомов больничной среды, пациентов и медицинского персонала. Оценка альфа-разнообразия основана на учёте видового богатства (числа видов, отнесённого к единице площади) и равномерности распределения видов по их обилию в сообществе. При этом оцениваются доминирующие, сопутствующие и редкие виды (относительное обилие менее 1%). Бета-разнообразие характеризует изменчивость показателей альфа-разнообразия в пространстве — по градиентам факторов среды или при переходе от одного типа сообщества к другому. Оно оценивается через индексы сходства и гетерогенности. Для характеристики биоразнообразия наиболее часто используют индексы Шеннона, Симпсона, $Chao1$, Брея–Кертиса, Сёренсена–Дайса и др. Они отражают сложность структуры микробного сообщества и степень доминирования тех или иных бактерий [22].

Мультиомные технологии, включая метатранскриптомный, метапротеомный и метаболомный подходы, предоставляют подробную информацию о микробной активности в окружающей среде. Установлено, что существует устойчивое ядро больничного микробиома, в котором подавляющее большинство микроорганизмов необходимы для функционирования больничной экосистемы и не относятся к числу микроорганизмов, вызывающих инфекционный процесс у человека. Образованные ими сложные сообщества представлены большим количеством таксонов, в которых видовые взаимодействия и коммуникация имеют решающее значение для динамики популяции и функциональной активности [23].

Исследования микробиома больничной среды в период, когда здания ещё не были сданы в эксплуатацию, подтвердили наличие этого достаточно разнообразного и устойчивого микробного сообщества, к которому впоследствии, с началом работы клиники, добавились микроорганизмы, типичные для кожи человека. С течением времени биоразнообразие значительно снижалось [24].

Из-за малой изученности микробиома больничной среды молекулярно-генетическими тех-

нологиями не существует единой точки зрения на степень микробного разнообразия в разных медицинских организациях. Немногочисленные исследования сосредоточены на отделениях интенсивной терапии для взрослых и детей [25, 26]. К.М. Hewitt и соавт. выявили, что каждая поверхность, с которой были взяты образцы в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорождённых, была заселена десятками и сотнями родов бактерий, в среднем около 100 родов бактерий на поверхность [27]. Установлено, что значимое ($W = 110$; $p = 1,3 \times 10^{-7}$) снижение микробного разнообразия на поверхностях на 50% сопровождалось значительным ($W = 202,5$; $p = 0,01$) повышением (на 20%) доли резистентных штаммов бактерий [10].

М.М. Mustapha и соавт., используя методы сравнительной геномики, выявили огромное разнообразие бактериальных патогенов. Они идентифицировали бактерии, принадлежащие к 97 различным видам, которые охватывали 14 различных видовых групп. Кроме того, были идентифицированы 23 вида, которые ранее не были описаны, включая потенциально новые виды *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* и *Stenotrophomonas*. В общей сложности 41 (1,4%) изолят принадлежал к этим потенциально новым видам [28]. Однако выраженное микробное разнообразие выявлено не только у потенциально патогенных видов бактерий, обитающих на поверхностях больничной среды. К. Li и соавт. с помощью секвенирования гена 16S рРНК показали, что протеобактерии и фирмикуты были наиболее важными типами в двух отделениях интенсивной терапии в Китае (70,55 и 15,58% всех образцов соответственно) [29]. R. Dai и соавт. исследовали больничный микробиом в период пандемии COVID-19 и также выявили преобладание *Firmicutes* (51,6%), *Bacteroidetes* (25%), протеобактерий (13,6%), в то время как доминирующими грибами были *Ascomycota* и *Basidiomycota* (39,4 и 14,2% соответственно) [30]. Также стоит отметить, что *Propionibacterium* не были обнаружены в числе доминантных, как это было выявлено в предыдущих исследованиях [29, 31].

Значительное микробное разнообразие было продемонстрировано и нами при изучении пыли больничных вентиляционных решеток [32].

В исследовании Р.Н. Rampelotto и соавт. сложная картина взаимосвязей между бактериальными таксонами, сосуществующими в больничной среде, изучена с помощью сетевого анализа [18]. Модель сетевого анализа в условиях глубокой неопределённости позволяет рассматривать различные сценарии развития ситуации. Индекс центральности при этом выявляет ключевые элементы, играющие в системе главную роль. Вопреки предыдущим исследованиям [11], было показано, что госпитальный микробиом гомогенен, имеет однородную структуру, в ко-

торой несколько таксонов доминируют, а остальные компоненты микробной сети обладают низкой связностью, образующей кластерную топологию [18]. Эти структурные свойства открывают возможности для понимания, какие микроорганизмы наиболее важны для поддержания структуры и взаимодействия микробных сообществ в больничных учреждениях. Ключевым видом является таксон, значение которого для поддержания структуры сообщества относительно выше, чем у других, и его идентификация имеет первостепенное значение [33]. К настоящему времени проведено ограниченное число исследований, посвящённых событиям, связанным с микробной конкуренцией в пространственном и мультиплексированном виде, отчасти из-за отсутствия доступных инструментов.

Р.Н. Rampelotto и соавт. показали, что стратегия выявления мутуалистических и конкурентных межмикробных отношений может быть использована в качестве теоретической основы для выявления потенциально сильных отрицательных корреляций между патогенами и другими видами, чтобы определить, как один вид препятствует росту другого, и установить, какие компоненты участвуют в таких взаимодействиях [18]. В качестве доказательства концепции, используя совместное культивирование *in vitro*, D.J. Gonzalez и соавт. продемонстрировали, что *Bacillus subtilis*, которая почти вездесуща в природе, способна ингибировать рост эпидемиологического изолята *Staphylococcus aureus* и обладает способностью направленно высвобождать молекулу с антимикробными и изменяющими метаболизм свойствами [34].

Без регулярной инокуляции ассоциированные с человеком бактерии не сохраняются в высоком относительном количестве на поверхностях больничной среды. Эти бактерии, адаптированные к существованию на коже своего хозяина-человека, могут быть вытеснены устойчивыми видами, связанными с окружающей средой [14]. Некоторые экологические виды (например, *Bacillus* spp.) способны выживать в средах с низким содержанием питательных веществ, благодаря таким действиям, как прямой антагонизм, конкуренция за ограниченные ресурсы и/или образование спор [35–37].

М.М. Mustapha и соавт. установили, что у *Clostridium difficile* самая низкая скорость эволюции, у ванкомицинрезистентных энтерококков и метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* были промежуточные показатели, а у *Pseudomonas aeruginosa* — самые высокие. Показатели в целом варьировали почти в 100 раз среди исследованных видов от 0,4 одиночных полиморфизмов на геном в год для *C. difficile* до 28,80 для *P. aeruginosa*. Эти данные отчасти объясняют различие в скорости формирования госпитальных штаммов (клонов) у разных видов бактерий [28].

Применение методов на основе секвенирования нового поколения позволяет продемонстрировать горизонтальный перенос генетического материала между микроорганизмами посредством конъюгации, однако трансформация и трансдукция также могут распространять гены устойчивости и вирулентности [38].

Из-за значительного обмена между микробиомом человека, в частности кожей и кишечным трактом, и микробиомом больничной среды (здания), существенная роль микробиома больничной среды очевидна, но далека от полного понимания [39, 40].

К устойчивому ядру больничного микробиома добавляется более изменчивая часть микроорганизмов, которые обладают вирулентностью, часто высокорезистентны к антимикробным средствам и могут вызывать патологические процессы у пациентов. Таксономический состав этой части больничного микробиома зависит от типа отделения, медицинских технологий, пациентов и в значительной степени коррелирует с микробиотой кожи человека. Его вариабельность также может определяться особенностями микробиома за пределами медицинской организации и зависеть от климатических факторов, таких как среднесуточная сезонная температура и влажность. В отделениях интенсивной терапии микробное сообщество значительно вариабельно в зависимости от сезона года, тем не менее несколько видов патогенов присутствуют на поверхностях больничной среды круглогодично, однако сведения о таких взаимосвязях очень ограничены [29].

Ещё предстоит определить, является ли вариация микробиома по существу стохастическим процессом, или более глубокий анализ позволит выявить закономерности [41].

Заключение

Несмотря на очень скудные данные, которыми мы располагаем, очевидно, что молекулярно-генетические технологии открыли нам качественно новые возможности изучения больничного микробиома. Это новое направление позволит понять, как устроено ядро микробиома, какие таксоны играют ключевую стабилизирующую роль, какие изменения этой структуры влияют на процесс формирования госпитальных штаммов (клонов), какие детерминанты являются наиболее информативными с точки зрения мониторинга и прогноза эпидемического неблагополучия. Эти новые знания наряду с программами рационального использования антибиотиков, эпидемиологическим надзором, изоляционно-ограничительными мерами, дезинфекцией и соблюдением протоколов гигиены рук обеспечат эффективные подходы к предотвращению инфекций, вызванных селекцией госпитальных штаммов микроорганизмов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Su C.H., Chang S.C., Yan J.J., et al. Excess mortality and long-term disability from healthcare-associated staphylococcus aureus infections: a population-based matched cohort study. *PLoS One*. 2013;8(8):e71055. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071055>
2. Kopp M.A., Watzlawick R., Martus P., et al. Long-term functional outcome in patients with acquired infections after acute spinal cord injury. *Neurology*. 2017;88(9):892–900. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003652>
3. Gidey K., Gidey M.T., Hailu B.Y., et al. Clinical and economic burden of healthcare-associated infections: A prospective cohort study. *PLoS One*. 2023;18(2):e0282141. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282141>
4. Protano C., Cammalleri V., Romano Spica V., et al. Hospital environment as a reservoir for cross transmission: cleaning and disinfection procedures. *Ann. Ig.* 2019;31(5):436–48. DOI: <https://doi.org/10.7416/ai.2019.2305>
5. Брусина Е.Б., Рычагов И.П. Профилактика внутрибольничных гнойно-септических инфекций в хирургических стационарах: новый взгляд на старую проблему. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2006;(1):18–21. Brusina Ye.B., Rychagov I.P. Prevention of hospital-acquired pyoseptic infections in surgical hospitals: a new view of the old problem. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2006;(1):18–21. EDN: <https://elibrary.ru/JTGnit>
6. Chng K.R., Li C., Bertrand D., et al. Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment. *Nat. Med.* 2020;26(6):941–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0894-4>
7. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П. и др. Госпитальный штамм – непознанная реальность. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013;(1):30–5. Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., et al. Hospital strain – mysterious reality. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013;(1):30–5. EDN: <https://elibrary.ru/pvsumn>
8. Brooks B., Firek B.A., Miller C.S., et al. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome*. 2014;2(1):1. DOI: <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-1>
9. Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. и др. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: современная доктрина профилактики. Часть I. Исторические предпосылки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(5):17–24. Brusina E.B., Zuyeva L.P., Kovalishena O.V., et al. Healthcare-associated infections: modern doctrine of prophylaxis. Part I. Historical background. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(5):17–24. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-17-24> EDN: <https://elibrary.ru/yqxuyx>
10. Mahnert A., Moissl-Eichinger C., Zojer M., et al. Man-made microbial resistances in built environments. *Nat. Commun.* 2019;10(1):968. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08864-0>
11. Lax S., Gilbert J.A. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. *Trends Mol. Med.* 2015;21(7):427–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.03.005>
12. Eisen J. What does the term microbiome mean? And where did it come from? A bit of a surprise. *Winnower*. 2015;142971.16196. DOI: <https://doi.org/10.15200/winn.142971.16196>
13. Berg G., Rybakova D., Fischer D., et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(1):103. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
14. Chopyk J., Akrami K., Bavly T., et al. Temporal variations in bacterial community diversity and composition throughout

- intensive care unit renovations. *Microbiome*. 2020;8(1):86. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00852-7>
15. Danko D., Bezdán D., Afshin E.E., et al. A global metagenomic map of urban microbiomes and antimicrobial resistance. *Cell*. 2021;184(13):3376–93.e17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.002>
 16. Westwood J., Burnett M., Spratt D., et al. The hospital microbiome project: meeting report for the UK science and innovation network UK-USA workshop ‘beating the superbugs: hospital microbiome studies for tackling antimicrobial resistance’, October 14th 2013. *Stand Genomic Sci*. 2014;9:12. DOI: <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-12>
 17. Mandal S., Van Treuren W., White R.A., et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Health Dis*. 2015;26:27663. DOI: <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>
 18. Rampelotto P.H., Sereia A.F.R., de Oliveira L.F.V., et al. Exploring the hospital microbiome by high-resolution 16S rRNA profiling. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(12):3099. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20123099>
 19. Chen C.H., Lin Y.L., Chen K.H., et al. Bacterial diversity among four healthcare-associated institutes in Taiwan. *Sci. Rep*. 2017; 7(1):8230. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08679-3>
 20. Afshinnekoo E., Bhattacharya C., Burguete-García A., et al. COVID-19 drug practices risk antimicrobial resistance evolution. *Lancet Microbe*. 2021;2(4):e135–6. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00039-2)
 21. Fresia P., Antelo V., Salazar C., et al. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. *Microbiome*. 2019;7(1):35. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0648-z>
 22. Кройдер А.С., Комарова М.В. Использование индексов биологического разнообразия для анализа микробиоты человека. *Universum: медицина и фармакология*. 2022;3(3):13–7. Kroyder A.S., Komarova M.V. Using biological diversity indices for human mycobiota analysis. *Universum: Medicine & Pharmacology*. 2022;3(3):13–7. EDN: <https://elibrary.ru/UACXWS>
 23. Bassler B.L. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*. 2002;109(4):421–4. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00749-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00749-3)
 24. Lax S., Sangwan N., Smith D., et al. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. *Sci. Transl. Med*. 2017;9(391):eaah6500. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6500>
 25. Brooks B., Firek B.A., Miller C.S., et al. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome*. 2014;2(1):1. DOI: <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-1>
 26. Poza M., Gayoso C., Gomez M.J., et al. Exploring bacterial diversity in hospital environments by GS-FLX Titanium pyrosequencing. *PLoS One*. 2012;7(8):e44105. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044105>
 27. Hewitt K.M., Mannino F.L., Gonzalez A., et al. Bacterial diversity in two Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *PLoS One*. 2013;8(1):e54703. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054703>
 28. Mustapha M.M., Srinivasa V.R., Griffith M.P., et al. Genomic diversity of hospital-acquired infections revealed through prospective whole-genome sequencing-based surveillance. *mSystems*. 2022;7(3):e0138421. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.01384-21>
 29. Li K., Zhu Q., Jiang F., et al. Monitoring microbial communities in intensive care units over one year in China. *Sci. Total Environ*. 2022;811:152353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152353>
 30. Dai R., Wu H., Liu G., et al. Investigation of bacterial and fungal population structure on environmental surfaces of three medical institutions during the COVID-19 pandemic. *Front. Microbiol*. 2023;14:1089474. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1089474>
 31. Shobo C.O., Alisoltani A., Abia A.L.K., et al. Bacterial diversity and functional profile of microbial populations on surfaces in public hospital environments in South Africa: a high throughput metagenomic analysis. *Sci. Total Environ*. 2020;719:137360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137360>
 32. Chezganova E., Efimova O., Sakharova V., et al. Ventilation-associated particulate matter is a potential reservoir of multidrug-resistant organisms in health facilities. *Life (Basel)*. 2021;11(7):639. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11070639>
 33. Cottee-Jones H.E.W., Whittaker R.J. The keystone species concept: a critical appraisal. *Front. Biogeogr*. 2012;4(3):117–27. DOI: <https://doi.org/10.21425/F54312533>
 34. Gonzalez D.J., Haste N.M., Hollands A., et al. Microbial competition between *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* monitored by imaging mass spectrometry. *Microbiology*. 2011;157(Pt. 9):2485–92. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.048736-0>
 35. Lax S., Smith D.P., Hampton-Marcell J., et al. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science*. 2014;345(6200):1048–52. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1254529>
 36. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., et al. Peterson S.B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol*. 2010;8(1):15–25. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
 37. Suva M.A., Sureja V.P., Kheni D.B. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: mechanism of action and clinical applications. *J. Curr. Res. Sci. Med*. 2016;2(2):65. DOI: <https://doi.org/10.4103/2455-3069.198381>
 38. Lermينياux N.A., Cameron A.D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can. J. Microbiol*. 2019;65(1):34–44. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
 39. Stephens B. What have we learned about the microbiomes of indoor environments? *mSystems*. 2016;1(4):e00083-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00083-16>
 40. Comar M., D’Accolti M., Cason C., et al. Introduction of NGS in environmental surveillance for healthcare-associated infection control. *Microorganisms*. 2019;7(12):708. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120708>
 41. Cruz-López F., Martínez-Meléndez A., Garza-González E. How does hospital microbiota contribute to healthcare-associated infections? *Microorganisms*. 2023;11(1):192. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010192>

Информация об авторе

Брусина Елена Борисовна[✉] — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. каф. эпидемиологии, инфекционных болезней и дерматовенерологии Кемеровского государственного медицинского университета, Кемерово, Россия, brusina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

Статья поступила в редакцию 02.04.2024;
принята к публикации 30.05.2024;
опубликована 29.06.2024

Information about the author

Elena B. Brusina[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, RAS Corresponding Member, Head, Department of epidemiology, infectious diseases, dermatology and venereology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, brusina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

The article was submitted 02.04.2024;
accepted for publication 30.05.2024;
published 29.06.2024



Анализ аэриобиологических исследований с ортопоксвирусами, проводимых Министерством обороны США

Онищенко Г.Г.^{1,2}, Кириллов И.А.³, Борисевич С.В.^{2,4}, Сизикова Т.Е.⁴, Кротков В.Т.⁴

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия;

²Российская академия наук, Москва, Россия;

³Управление начальника войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, Москва, Россия;

⁴48 Центральный научно-исследовательский институт, Сергиев Посад-6, Россия

Аннотация

Прекращение вакцинации после завершения «Программы глобальной ликвидации натуральной оспы» привело к резкому снижению уровня коллективного иммунитета не только к натуральной оспе, но и к другим ортопоксвирусным (ОПВ) инфекциям. За последние 10–15 лет в мире произошло увеличение частоты заболеваний, вызванных вирусами оспы коров, оспы буйволов, оспы верблюдов. В 2022–2023 гг. произошла вспышка трох (заболевание, вызываемое вирусом оспы обезьян). Анализ данных литературы об организации генома ОПВ позволяет предположить, что возбудитель натуральной оспы мог в прошлом возникнуть в результате эволюционных изменений зоонозного вируса-прародителя. В связи с этим существует угроза возникновения нового особо опасного антропоозноза, возбудитель которого может возникнуть как естественным, так и искусственным путём.

Целью обзора является анализ опубликованных в открытых научных источниках данных об аэриобиологических исследованиях с ОПВ, проводимых Министерством обороны США в 1994–2013 гг. — в период ограничения научных исследований и хранения образцов вирусов оспы. Публикации результатов аэриобиологических исследований с ортопоксвирусами, проводимых Минобороны США после 2013 г., в открытых научных источниках авторами не найдены.

Результаты аэриобиологических исследований с ОПВ свидетельствуют о заинтересованности военного ведомства США в проведении экспериментальных работ двойного назначения, включают мониторинг за свойствами ОПВ и возможное изменение их патогенности для человека, выбор оптимальных лабораторных моделей для изучения свойств ОПВ и возможности моделирования свойств вируса натуральной оспы при использовании других ОПВ (вирусы оспы коров, оспы кроликов, оспы обезьян), моделирование основных характеристик заболевания, вызываемого вирусом натуральной оспы, у человека и оценка эффективности имеющихся и вновь разрабатываемых вакцин против натуральной оспы, сравнительное изучение эффективности противовирусных лекарственных средств для профилактики или экстренной профилактики натуральной оспы и оспы обезьян.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, вирус натуральной оспы, вирус оспы кроликов, вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, лабораторная модель, моделирование свойств вируса, средства медицинской защиты

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: Онищенко Г.Г., Кириллов И.А., Борисевич С.В., Сизикова Т.Е., Кротков В.Т. Анализ аэриобиологических исследований с ортопоксвирусами, проводимых Министерством обороны США. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):399–411.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-522>

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

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-522>

Analysis of aerobiological studies with orthopoxviruses by U.S. Department of Defense

Gennadiy G. Onishchenko^{1,2}, Igor A. Kirillov³, Sergey V. Borisevich^{2,4✉},
Tatiana E. Sizikova⁴, Victor T. Krotkov⁴

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

²Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³Management of the Chief of the Nuclear, Biological and Chemical Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation, Moscow, Russia;

⁴48 Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad-6, Russia

Abstract

Discontinuation of vaccination after the completion of Smallpox global eradication program led to a sharp decrease in the level of collective immunity not only to smallpox but also to other orthopoxvirus infections. Over the past 10–15 years, the world has seen an increase in the frequency of diseases caused by smallpox viruses of cows, buffaloes, camels. The outbreak of mpox (a disease caused by the monkey pox virus) occurred in 2022–2023. Analysis of the literature data on the organization of the orthopoxvirus genome suggest that smallpox could have occurred in the past as a result of evolutionary changes in the zoonotic progenitor virus. In this regard, there is a threat of a new particularly dangerous anthroozoonosis, the pathogen of which can occur both naturally and artificially.

The aim of the review is to analyze open science published data on aerobiological research with OPVs conducted by the U.S. Department of Defense from 1994–2013, which was a period of restricted research and storage of smallpox virus samples. The authors did not find any publications of the results of aerobiological research with orthopoxviruses conducted by the US Department of Defense after 2013 in open scientific sources.

The review presents a data analysis in Russian and English-speaking scientist publication as well as those posted on the Internet.

The presented results of aerobiological studies with orthopoxviruses indicate the interest of the US military department in carrying out experimental work of dual use, including monitoring of the properties of orthopoxviruses and a possible change in their pathogenicity for humans, selection of optimal laboratory models for studying the properties of orthopoxviruses, and the possibility of modeling the properties of the smallpox virus when using other orthopoxviruses (cowpox virus, rabbit pox virus, monkey pox virus), modeling of the main characteristics of the disease caused by the smallpox virus in humans and evaluation of the effectiveness of existing and newly developed vaccines against smallpox, comparative study of effectiveness of antiviral drugs for regular or post-exposure prophylaxis of naturally occurring smallpox and monkey smallpox.

Keywords: *orthopoxviruses, smallpox virus, rabbitpox virus, monkeypox virus, cowpox virus, laboratory model, modeling of virus properties, medical protection products*

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: Onishchenko G.G., Kirillov I.A., Borisevich S.V., Sizikova T.E., Krotkov V.T. Analysis of aerobiological studies with orthopoxviruses by U.S. Department of Defense. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):399–411.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-522>

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

Введение

Прекращение вакцинации после завершения «Программы глобальной ликвидации натуральной оспы» привело к опасной ситуации, т. к. значительная часть населения земного шара стала восприимчивой как к натуральной оспе, так и к другим патогенным для человека ортопоксвирусам (ОПВ) в результате утраты популяционного имму-

нитета [1, 2]. Последнее может привести к чрезвычайной эпидемической ситуации мирового масштаба [2, 3].

Наглядным примером этого служит развитие вспышки оспы обезьян в 2022–2023 гг. (с 28.11.2023 заболевание переименовано Таксономическим комитетом и носит название «мпокс») [4], увеличение за последние 10–15 лет частоты возникновения в

мире заболеваний, вызванных вирусами оспы коров, оспы буйволов, оспы верблюдов [5].

В природе практически на всех континентах циркулируют представители различных зооантропонозных ОПВ, которые периодически вызывают заболевания среди животных и людей. Так, в Бразилии и других частях Южной Америки зарегистрированы отдельные случаи поксвирусных инфекций [6, 7]. В выделенных от людей и скота изолятах была установлена высокая степень их близости к вирусу вакцины [8, 9]. При исследовании возможной роли приматов в качестве носителей вакциноподобных вирусов был обнаружен высокий процент серопозитивных результатов [10].

Анализ данных литературы об организации генома ОПВ позволяет предположить, что возбудитель натуральной оспы мог в прошлом возникать в результате эволюционных изменений зоонозного вируса-прародителя. В связи с этим существует угроза возникновения нового особо опасного антропоноза [11–13].

Целью обзора является анализ опубликованных в открытых научных источниках данных об аэриобиологических исследованиях с ОПВ, проводимых Министерством обороны США в 1994–2013 гг. В этот период Всемирной организацией здравоохранения были введены ограничения на научные исследования и хранение образцов вирусов оспы для всех учреждений мира, за исключением двух международных репозитариев: Центра по контролю и профилактике заболеваний (США) и Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Россия)¹.

Публикации результатов аэриобиологических исследований с ортопоксвирусами, проводимых Минобороны США после 2013 г., в открытых научных источниках авторами не найдены.

Для изучения многочисленных аспектов инфекции специалисты научно-исследовательских учреждений Министерства обороны США активно используют различных лабораторных животных и патогенных для них ОПВ. Это белые мыши, низшие приматы (главным образом, яванские макаки, макаки резус) и кролики. Для инфицирования мышей использовали вирусы экстремелии, оспы коров и оспы вакцины, кроликов — вирусы оспы кроликов и оспы вакцины, обезьян и вирус натуральной оспы [14–16]. По мнению американских исследователей, оптимальная модель должна сочетать в себе возможность использования для инфицирования животных низкой заражающей дозы и передачу вируса от больного животного здоровому. Особенности

распространения натуральной оспы в наибольшей степени моделируются с помощью экспериментальных работ с оспой кроликов и обезьян.

Значение вируса оспы кроликов как модельного агента для изучения ОПВ-инфекций, было продемонстрировано еще в начале 1960-х гг., когда было показано, что гипериммунные сыворотки обеспечивают защиту аэрогенно инфицированных кроликов при немедленном введении после инфицирования в дозе 175 БОЕ на особь или даже спустя 3 сут после инфицирования. В данном опыте была использована сухая биологическая рецептура со средним размером частиц около 1 мкм [17].

Поскольку частицы аэрозоля размером более 10 мкм задерживаются в верхних отделах дыхательных путей, практически во всех экспериментах по аэрогенному инфицированию, проведенных сотрудниками Института инфекционных заболеваний армии США (USAMRIID), медианный диаметр генерируемых частиц, проникающих в нижние отделы дыхательных путей, составляет 1 мкм [18]. Ряд показателей, характеризующих течение оспы кроликов у аэрогенно инфицированных животных, позволяет моделировать заболевание натуральной оспой человека (**табл. 1**).

Так, при низких заражающих дозах (< 200 БОЕ) инкубационный период составлял 4–6 сут. Первым клиническим признаком заболевания являлась лихорадка, затем отмечались анорексия, слабость, быстрая потеря массы тела, депрессия, вялость, падение температуры тела до субнормальных значений и гибель на 8–14-е сутки после инфицирования.

При высоких заражающих дозах (более 200 БОЕ) вирус оспы кроликов вызывал быстро прогрессирующую летальную инфекцию, напоминающую геморрагическую форму натуральной оспы. Инкубационный период заболевания в этом случае составлял 2–3 сут. Заболевание заканчивалось гибелью на 6-е сутки.

По данным специалистов Центра аэриобиологических исследований USAMRIID, величина ЛД₅₀ при аэрогенном инфицировании кроликов вирусом оспы кроликов составляет 15 БОЕ [19]. Этот результат совпадает с данными, полученными H.S. Bedson и соавт. в 1963 г. при использовании сухого препарата вируса оспы кроликов [20].

При аэрогенном инфицировании кроликов мелкодисперсным аэрозолям и изучении процесса распространения заболевания от одного животного к другому моделируются указанные показатели при натуральной оспе. Следовательно, вирус оспы кроликов может быть использован для тестирования защитных препаратов против натуральной оспы [19]. Вирус оспы кроликов может быть использован для моделирования таких характеристик вируса натуральной оспы, как способность вызывать аэрогенное инфицирование в условиях низкой заражающей

¹ World Health Organization. Report of the meeting of the Ad hoc Committee on orthopoxvirus infections (Geneva, 09.09.1994). URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/59062/WHO_CDS_BVI_94.3.pdf?sequence=1

Таблица 1. Сходство и различия между натуральной оспой и оспой кроликов (при аэрозольном способе заражения) [19]
Table 1. Similarities and differences between smallpox and rabbit pox (by aerosol route of infection) [19]

Показатель Parameter	Нозологическая форма Nosological form		
	натуральная оспа (обычный тип) Smallpox (common type)	оспа кроликов (заражающая доза < 200 БОЕ) rabbitpox (infectious dose < 200 PFU)	оспа кроликов (заражающая доза > 200 БОЕ) rabbitpox (infectious dose > 200 PFU)
Способ передачи Transmission method	Аэрозольный Aerosol		
Инкубационный период, сут Incubation period, days	7–17	4–6	2–3
Продромальная фаза, сут Prodromal phase, days	2–4		0–2
Клинические признаки заболевания Clinical signs of the disease	Лихорадка, фарингит, повреждения на коже Fever, pharyngitis, skin lesions	Лихорадка, фарингит, повреждения на коже, эрозии в носоглотке Fever, pharyngitis, skin lesions, erosions in the nasopharynx	Лихорадка, фарингит, повреждения на коже, эрозии в носоглотке Fever, pharyngitis, skin lesions, erosions in the nasopharynx
Характеристика повреждений кожи Characterization of skin lesions	Макулы — папулы — везикулы — пустулы — корки — оспины Macules — papules — vesicles — pustules — crusts — pospinas	Макулы — папулы — везикулы — пустулы Macules — papules — vesicles — pustules	Макулы — папулы — везикулы Macules — papules — vesicles
Осложнения Complications	Пневмония, слепота, энцефалит Pneumonia, blindness, encephalitis	Пневмония, множественные некрозы Pneumonia, multiple necroses	
Летальность заболевания, % Lethality of the disease, %	≈ 30	≈ 100	100
Время гибели, сутки с начала заболевания Time of death, day from the beginning of the disease	22–28	8–14	5–7

дозы и способность передачи инфекции от больных здоровым [19]. М. Nicas и соавт. проведена оценка математической модели, определяющей инфекционную дозу вируса натуральной оспы для условий аэрогенного инфицирования [21]. Авторы сделали вывод о том, что для инфицирования человека достаточно одного полноценного вириона.

С. J. Roy и соавт. провели сравнительное изучение эффективности неспецифических средств защиты в отношении натуральной оспы [22]. При использовании в качестве модельного агента вируса оспы кроликов испытаны противовирусные препараты тиосемикарбазон, цидофовир и ST-246. Для сравнения проведены опыты с введением животным специфического защитного средства — очищенной гипериммунной сыворотки кролика. Данные об эффективности указанных противовирусных препаратов при аэрогенном инфицировании животных вирусом оспы кроликов (табл. 2) свидетельствуют о том, что полная защита животных выявлена при использовании цидофовира в дозе 10 мг/кг массы животного в течение 3 сут при первом введении либо немедленно, либо спустя 24 ч после инфицирования, и ST-246 при введении в дозе 40 мг/кг массы

животного в течение 14 сут (при первом введении немедленно после инфицирования). Тиосемикарбазон обеспечивал лишь частичную защиту.

А. Nalca и соавт. [19] и N.L. Garsa и соавт. [23] провели проверку эффективности противооспенной вакцины третьего поколения (NVA-BN) при аэрогенном инфицировании кроликов вирусом оспы кроликов. При однократной иммунизации низкой дозой вакцины у части кроликов наблюдали отдельные признаки заболевания, но все животные выжили (табл. 3). При двукратной иммунизации с интервалом 14 сут или при однократной иммунизации высокой дозой вакцины признаки заболевания у животных отсутствовали.

На основании проведённых исследований специалисты отделов патологии, токсикологии и аэриобиологии USAMRIID рассматривают вирус оспы кроликов как перспективный агентный имитатор в отношении вируса натуральной оспы [24, 25].

В 1999 г. вирус оспы обезьян включён Специальной группой государств — участников Конвенции о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия и об их уничтожении

ОБЗОРЫ

Таблица 2. Результаты оценки эффективности специфических и неспецифических средств защиты в отношении ОПВ (при использовании в качестве модельного агента вируса оспы кроликов, штамм Утрехт, при аэрогенном инфицировании) [22]

Table 2. Results of evaluation of the effectiveness of specific and nonspecific means of protection against OPV (using rabbit pox virus, Utrecht strain, as a model agent in case of aerogenic infection) [22]

Инфицирующая доза БОЕ, Ме, Д PFU infectious dose, Me, D	Препарат Preparation	Схема введения, обеспечивающая: Administration process that provides:	
		полную защиту total protection	частичную защиту partial protection
175 (146–175)	Очищенная гипериммунная сыворотка Purified hyperimmune serum	10 мл разведения 1 : 100 при введении спустя 1 сут после инфицирования или 10 мл цельного препарата при введении на 3-и сутки после инфицирования 10 ml of 1 : 100 dilution when administered 1 day after infection or 10 ml of whole drug when administered on the 3 rd day after infection	10 мл разведения 1 : 10 при введении на 3-и сутки после инфицирования 10 ml of 1 : 10 dilution when administered on the 3 rd day after infection
> 1000	Тиосемикарбазон Thiosemicarbazone	Нет None	100–200 мг/кг массы животного ежедневно в течение 4 сут 100–200 mg/kg of animal weight daily for 4 days
2860 (1140–5000)	ST-246	40 мг/кг массы животного в течение 14 сут при 1-м введении немедленно после инфицирования 40 mg/kg of animal weight for 14 days at the first injection immediately after infection	40 мг/кг массы животного в течение 14 сут при 1-м введении, спустя 24, 48 или 72 ч после инфицирования 40 mg/kg animal weight for 14 days at first injection, 24, 48 or 72 h after infection
296 (96–468)	Цидофовир Cidofovir	10 мг/кг массы животного в течение 3 сут при первом введении либо немедленно, либо спустя 24 ч после инфицирования 10 mg/kg animal weight for 3 days at first injection, either immediately or 24 h after infection	1 мг/кг массы животного в течение 3 сут при первом введении либо немедленно, либо спустя 24 ч после инфицирования 1 mg/kg animal weight for 3 days at the first injection either immediately or 24 h after infection

Примечание. Ме — медиана инфицирующей дозы; Д — диапазон варьирования инфицирующей дозы при проведении эксперимента.
Note. Me — median infectious dose; D — range of variation of infectious dose during the experiment.

Таблица 3. Результаты оценки эффективности оспенной вакцины третьего поколения (MVA-BN) при аэрогенном инфицировании кроликов вирусом оспы кроликов [19]

Table 3. Results of the evaluation of the efficacy of the third-generation smallpox vaccine (MVA-BN) in aerogenic infection of rabbits with rabbit pox virus [19]

Группа животных Animal group	Доля животных с признаками заболевания, % Percentage of animals with signs of disease, %	Доля выживших животных, % Percentage of surviving animals, %
Однократно иммунизированные низкой дозой вакцины с последующим инфицированием Once immunized with a low dose of vaccine followed by infection	30	100
Двукратно иммунизированные низкой дозой вакцины с последующим инфицированием Twice immunized with a low dose of vaccine followed by infection	0	100
Однократно иммунизированные высокой дозой вакцины Once immunized with a high dose of vaccine	0	100
Контрольная группа (инфицированные животные без иммунизации) Control group (infected animals without immunization)	100	0
Контрольная группа (однократно иммунизированные высокой дозой вакцины без инфицирования) Control group (once immunized with a high dose of vaccine without infection)	0	100

Примечание. При разрешении иммунитета использовали инфицирующую дозу вируса оспы кроликов 200 БОЕ/особь. Низкая доза вакцины — 1×10^3 БОЕ/особь, высокая доза вакцины — 1×10^5 БОЕ/особь.

Note. An infectious dose of rabbit pox virus 200 CFU/animal was used in challenge experiments. The low vaccine dose was 1×10^3 PFU/specimen, and the high vaccine dose was 1×10^5 PFU/specimen.

в Перечень биологических агентов — патогенов человека, который был признан значимым в ракурсе разработки перечня биологически поражающих агентов для конкретных мер по укреплению «Конвенции...» [26]. Следует отметить, что согласно общественному мнению, сформированному до середины 1998 г., оспа обезьян рассматривалась как зоонозная инфекция, не имеющая существенного значения для патологии человека.

При анализе изложенных исследований (в том числе аэриобиологических), проводимых с вирусом оспы обезьян в ведущем специализированном зарубежном военно-медицинском центре — Институте инфекционных заболеваний армии США, можно выделить два значимых направления: моделирование основных характеристик заболевания, вызываемого вирусом натуральной оспы у человека, и оценка эффективности имеющихся и вновь разрабатываемых вакцин против натуральной оспы.

По мнению N. Nahon, сотрудника химического корпуса армии США, вирус оспы обезьян позволяет моделировать некоторые основные характеристики заболевания, вызываемого вирусом натуральной оспы у человека. Так, по данным литературы, к аэрогенному инфицированию вирусом натуральной оспы чувствительны 4 вида низших приматов (*Macaca cynomolgus*, *M. irus*, *M. rhesus* и *Saimiri*) [14].

Проведено изучение экспериментальной инфекции у яванских макак при аэрогенном инфицировании вирусом оспы обезьян [27]. В работе использован вирус оспы обезьян, штамм Заир-79, выделенный в 1979 г. в ходе заболевания человека, завершившегося летальным исходом. Посевной материал для формирования аэрозоля представлял собой надосадочную жидкость инфицированных клеток Vero. Средний массовый диаметр частиц

аэрозоля составлял 1,2 мкм, расчётная заражающая доза составляла от $1,0 \times 10^4$ до $1,4 \times 10^5$ БОЕ. В эксперименте были использованы яванские макаки обоего пола массой 1,6–4,7 кг. Инфицирующая доза была определена для каждой обезьяны во время всего срока экспозиции (10 мин). Отбор проб аэрозоля проводили в среду DMEM с пеногасителем. Определение концентрации вируса в пробах аэрозоля проводили путём последующего титрования полученных проб по методу негативных колоний на монослой клеток Vero.

Все инфицированные обезьяны погибли с 10-х по 17-е сутки после заражения (средний срок жизни до гибели животных составил 11,2 сут). Летальный исход связан с развитием бронхопневмонии. Корреляция между сроком гибели и инфицирующей дозой отсутствовала.

В последующем было проведено дополнительное изучение экспериментальной инфекции при аэрогенном инфицировании яванских макак вирусом оспы обезьян [28]. Инфицирование осуществляли с помощью автоматизированной системы экспозиции биологических аэрозолей, позволяющей обеспечивать точное введение инфицирующей дозы каждому животному в зависимости от его индивидуальных дыхательных характеристик. В опытах по аэрогенному инфицированию использовали штамм Заир V79. Как следует из данных, представленных в табл. 4, исход заболевания, видимо, определяется индивидуальными особенностями инфицированных животных, во всяком случае корреляция между вводимой дозой и долей погибших животных не прослеживалась. В то же время, по мнению зарубежных военных специалистов, клинические особенности заболевания яванских макак напоминают течение натуральной оспы у человека [29].

Таблица 4. Результаты изучения показателей экспериментальной инфекции при аэрогенном инфицировании яванских макак вирусом оспы обезьян [28]

Table 4. Results of the study of experimental infection indices during aerogenic infection of Javan macaques with monkeypox virus [28]

Показатель Indicator	Инфицирующая доза, БОЕ Infectious dose, PFU			
	$4,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$
Лихорадка Fever				
начало, сутки после инфицирования onset, day after infection	4,7	3,8	2,8	4,3
продолжительность, ч duration, h	215,3	244,7	266,7	278,1
Температура, °C Temperature, °C				
максимальное повышение от нормы maximum increase from normal	2,5	3,3	3,4	3,5
среднее повышение от нормы average increase from normal	1,9	1,9	2,1	2,3
Продолжительность жизни до гибели, сут Life expectancy before death, days	10,0	9,0	9,6	8,5
Доля погибших животных Percentage of dead animals	2/3	4/6	5/6	2/3

Таблица 5. Расчётная концентрация вируса в крови обезьян, аэрогенно инфицированных вирусом оспы обезьян, БОЕ/см³ [31]

Table 5. Estimated virus concentration in the blood of monkeys aerogenically infected with monkeypox virus, PFU/cm³ [31]

Инфицирующая доза, БОЕ/см ³ Infectious dose, PFU/cm ³	Срок после инфицирования, сут Time after infection, days								
	0	2	4	6	8	10	14	18	21
4,2 × 10 ⁴	< 200	< 200	5,1 × 10 ³	7,0 × 10 ⁴	1,5 × 10 ⁵	4,0 × 10 ⁵	3,1 × 10 ⁵	1,2 × 10 ³	< 200
2,5 × 10 ⁴	< 200	< 200	< 200	7,4 × 10 ⁴	3,0 × 10 ⁵	2,6 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁴	< 200	< 200
1,2 × 10 ⁵	< 200	< 200	7,8 × 10 ³	1,8 × 10 ⁵	2,7 × 10 ⁵	**	–	–	–
2,8 × 10 ⁵	< 200	< 200	< 200	9,1 × 10 ⁴	3,6 × 10 ⁵	**	–	–	–
3,9 × 10 ⁵	< 200	< 200	9,3 × 10 ³	4,8 × 10 ⁵	*	–	–	–	–
9,3 × 10 ⁵	< 200	< 200	2,5 × 10 ⁴	6,9 × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁶	4,8 × 10 ⁶	***	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 6: < 200 — концентрация возбудителя в крови ниже величины чувствительности метода ПЦР-ОТ (200 БОЕ/см³). *Животное погибло на 7-е сутки; **животное погибло на 9-е сутки; ***животное погибло на 12-е сутки после аэрогенно-инфицирования.

Note. Here and in Table 6: < 200 — concentration of the pathogen in blood is lower than the limit of detection of RT-PCR assay (200 PFU/cm³). *The animal died on the 7th day; **the animal died on the 9th day; ***the animal died on the 12th day after aerogenic infection.

Таблица 6. Расчётная концентрация вируса в носоглоточных смывах обезьян, аэрогенно инфицированных вирусом оспы обезьян, БОЕ/см³ [31]

Table 6. Estimated virus concentration in nasopharyngeal washings of monkeys aerogenically infected with monkeypox virus, PFU/cm³ [31]

Инфицирующая доза, БОЕ/м ³ Infectious dose, PFU/cm ³	Срок после инфицирования, сут Time after infection, days								
	0	2	4	6	8	10	14	18	21
4,2 × 10 ⁴	< 200	< 200	< 200	2,5 × 10 ³	1,1 × 10 ⁵	2,5 × 10 ⁵	3,1 × 10 ⁵	6,3 × 10 ³	< 200
2,5 × 10 ⁴	< 200	< 200	< 200	< 200	1,4 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁴	3,5 × 10 ³	< 200
1,2 × 10 ⁵	< 200	< 200	< 200	< 200	3,0 × 10 ⁴	**	–	–	–
2,8 × 10 ⁵	< 200	< 200	< 200	8,4 × 10 ²	2,1 × 10 ⁵	**	–	–	–
3,9 × 10 ⁵	< 200	< 200	3,2 × 10 ²	9,0 × 10 ⁵	*	–	–	–	–
9,3 × 10 ⁵	< 200	< 200	5,3 × 10 ³	5,8 × 10 ⁴	1,9 × 10 ⁶	4,6 × 10 ⁶	***	–	–

В дальнейшем была проведена оценка возможности использования полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ) для количественного определения вируса оспы обезьян в биопробах, полученных от аэрогенно инфицированных яванских макаков [30]. Установлено, что чувствительность метода составляла 200 БОЕ/см³. Заражающая доза составила от 2,5 × 10⁴ до 9,3 × 10⁵ БОЕ. Средний медианный размер частиц аэрозоля составлял 1,07 мкм и варьировал для каждого отдельного эксперимента в пределах 1,06–1,09 мкм. ЛД₅₀ для обезьян при данном способе инфицирования составила приблизительно 7,8 × 10⁴ БОЕ, время жизни до гибели — 7–10 сут после инфицирования. Проведено определение вирусемии и концентрации вируса в носоглоточных смывах у инфицированных животных с помощью экстраполяции результатов количественной ПЦР-ОТ.

Как следует из данных, представленных в табл. 5 и табл. 6, вирус оспы обезьян выявляется в крови и носоглоточных смывах на 4–18-е сутки после аэрогенного инфицирования. Начало выявления возбудителя коррелирует с заражающей дозой.

С учётом того, что течение оспы обезьян у яванских макаков может моделировать заболевание натуральной оспы человека, можно сделать вывод о том, что вероятность передачи вируса от больного здоровому достигает максимума на 8–10-е сутки (концентрация вируса в носоглоточных смывах имеет наивысшие значения и примерно соответствует концентрации вируса в крови).

Специалисты Министерства обороны США совместно с Центром по контролю и профилактике заболеваний США оценивали защитную эффективность вакцин второго поколения (Acam 2000) и третьего поколения (Imvamune). В опытах по аэрогенному инфицированию яванских макаков был использован вирус оспы обезьян, штамм Заир 79, инфицирующая доза составляла (2,1–3,1) × 10⁵ БОЕ на животное. Результаты, представленные в табл. 7, свидетельствуют о том, что, несмотря на достоверно не различающийся уровень вируснейтрализующих антител для животных групп 2 и 4, признаки заболевания в группе 4 были выражены в несколько большей степени. Сделан вывод о том, что использование аэрогенного инфицирования яванских макаков обеспечивает оценку эффективности различных

Таблица 7. Результаты оценки защитной эффективности оспенных вакцин 2-го и 3-го поколения (в отношении вируса оспы обезьян при аэрогенном инфицировании яванских макак) [32]**Table 7.** Results of evaluating the protective efficacy of 2nd and 3rd generation smallpox vaccines (against monkeypox virus during aerogenic infection of Javan macaques) [32]

Группа Group	Схема иммунизации Immunization process	Характеристика течения заболевания Characterization of the course of the disease				
		клини- ческие признаки clinical signs	время появления папул, сут time of papule appearance, days	среднее количество папул average number of papules	продолжитель- ность исчезно- вания папул, сут duration of papule disappearance, days	доля выживших животных, % survival rate, %
1	Введение буферированного физиологического раствора за 28 сут перед инфицированием (контроль) Administration of buffered saline 28 days before infection (control)	+++	6	51	Не исчезали Didn't disappear	0*
2	Введение Acam2000 однократно в дозе (2,5–12,5) × 10 ⁵ БОЕ за 28 сут перед инфицированием с помощью скарификации кожи Injection of Acam2000 once at a dose of (2.5–12.5) × 10 ⁵ PFU 28 days before infection by skin scarification	+	9	3	5	100
3	Подкожное введение Imvamune однократно в дозе 2,0 × 10 ⁸ ТЦПД ₅₀ за 28 сут перед инфицированием Subcutaneous injection of Imvamune once at a dose of 2.0 × 10 ⁸ TCPD ₅₀ 28 days before infection	++	9	10	5	67**
4	Подкожное введение Imvamune двукратно в дозе 2,0 × 10 ⁸ ТЦПД ₅₀ за 28 сут перед инфицированием Subcutaneous injection of Imvamune twice at a dose of 2.0 × 10 ⁸ TCPD ₅₀ 28 days before infection	+	6	7	5	100

Примечание. ТЦПД₅₀ — 50% тканевая цитопатическая доза. + — лёгкие; ++ — умеренные; +++ — выраженные признаки заболевания. *Животные погибли на 7–11-е сутки; **животные погибли на 7-е и 9-е сутки после аэрогенного инфицирования.

Note. TCPD₅₀ — 50% tissue cytopathic dose. + — mild; ++ — moderate; +++ — expressed signs of disease.

*Animals died on the 7th–11th day; **Animals died on the 7th and 9th day after aerogenic infection.

вакцин, предназначенных для иммунизации людей в тех условиях, когда проведение клинических испытаний не представляется возможным [32]. При этом было установлено, что динамика антителообразования у вакцинированных яванских макак сходна с таковой у вакцинированных людей [33, 34].

Несмотря на то что вирус оспы коров не относят к потенциальным биологически поражающим агентам, в ведущих зарубежных военно-медицинских центрах, в том числе в Институте инфекционных заболеваний армии США, проводятся исследования с указанным возбудителем. Анализ опубликованных в открытой печати данных указывает на то, что в исследованиях по оценке эффективности имеющихся и вновь разрабатываемых средств неспецифической профилактики в отношении натуральной оспы также используют вирус оспы коров.

Результаты оценки чувствительности белых мышей линии BALB/c к аэрогенному инфицированию вирусом оспы коров (табл. 8) свидетельствуют о том, что аэрогенное инфицирование белых мышей линии BALB/c массой 12 г вирусом оспы коров, штамм Brighton, в дозе 5 × 10⁶ БОЕ вызывает 100% гибель животных.

Данные о чувствительности инбредных белых мышей к интраназальному и аэрозольному инфицированию различными ОПВ (табл. 9) свидетельствуют о том, что все испытанные вирусы вызывали поражение дыхательных путей. При аэрозольном инфицировании вирусом оспы коров регистрировались также симптомы менингита и экзантемы.

Исследование морфологических изменений в тканях белых мышей линии BALB/c при интраназальном или аэрозольном инфицировании вирусом оспы коров, штамм Brighton (табл. 10) свидетельствует о том, что этот возбудитель является перспективным модельным агентом для проведения скрининговых испытаний средств неспецифической профилактики в отношении натуральной оспы. Это обусловлено тем, что вызываемое им заболевание при аэрозольном способе заражения белых мышей характеризуется разнообразной симптоматикой, а также тем, что данный возбудитель патогенен для человека, что упрощает возможность экстраполяции полученных данных относительно противовирусной эффективности исследуемых лечебных и профилактических препаратов.

Так, проведено изучение противовирусного действия цидофовира (1-[(S)-3 гидроксид-2]-(фос-

фонометокси)-пропил цитозин) на модели белых мышей линии BALB/c, аэрогенно инфицированных вирусом оспы коров, штамм Brighton [35]. Данный штамм вызывает бронхопневмонию у мышей BALB/c при аэрогенном инфицировании мелко-дисперсным аэрозолем (размер частиц 1 мкм) с последующей гибелью. Подкожное введение цидофовира в дозе 100 мг/кг (однократно) обеспечивало 90–100% защиту аэрогенно инфицированных животных при введении не позднее 4 сут после инфицирования. При введении цидофовира в день инфицирования титр вируса в лёгких уменьшался в 10–100 раз, снижалась выраженность вирусной пневмонии и предотвращались лёгочные кровотечения.

Введение цидофовира не вызывало увеличения концентрации мочевины, креатина, аспаргатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотках крови инфицированных и интактных животных. Установлено, что заболевание не развивалось при ежедневном подкожном введении цидо-

фовира в дозах 20,5 и даже 1 мг/кг. При этом важное значение имеет время первого введения препарата. Доза 5 мг/кг защищала практически 100% мышей при введении препарата в день инфицирования. Однако если начало введения препарата было отложено хотя бы на 1 сут, то для защиты животных требовалось ежедневное введение более высоких доз. Значительно более эффективным оказалось аэрозольное применение цидофовира [36, 37]. Результаты определения массы тела, концентрации вируса в лёгких, патологических изменений в лёгких и выживания инфицированных животных установили, что доза цидофовира в диапазоне 0,5–5,0 мг/кг всегда была более эффективной, чем доза 25 мг/кг, и иногда даже более эффективной, чем доза 100 мг/кг, при подкожном введении. Следовательно, противовирусная эффективность цидофовира во многом обусловлена задержкой препарата в респираторном тракте животных. В последующем была определена зависимость противовирусной эффективности цидофовира от схемы его введения в организм белых

Таблица 8. Результаты оценки чувствительности белых мышей линии BALB/c к аэрогенному инфицированию вирусом оспы коров [35]

Table 8. Results of evaluation of susceptibility of BALB/c white mice to aerogenic infection with cowpox virus [35]

Средняя масса животных, г Average weight of animals, g	Инфицирующая доза, БОЕ Infectious dose, PFU	Признаки заболевания Disease symptoms	Среднее время жизни до гибели, сут Average survival time to death, days	Доля погибших животных, % Percentage of dead animals, %
12	5 × 10 ⁶	Снижение массы тела, взъерошенная шерсть, значительное снижение функциональной активности Reduced body weight, ruffled coat, significant decrease in functional activity	12	100
	5 × 10 ⁴	Снижение массы тела, незначительное снижение функциональной активности Decrease in body weight, slight decrease in functional activity	–	0
	5 × 10 ²	Отсутствовали None	–	0
17	5 × 10 ⁶	Снижение массы тела и функциональной активности Decrease in body weight and functional activity	12	65

Таблица 9. Результаты изучения чувствительности белых мышей к аэрозольному инфицированию вирусами экстремелии, вакцины и оспы коров [16]

Table 9. Results of a study of the susceptibility of white mice to aerosolized infection with ectromelia, vaccinia and cowpox viruses [16]

Вирус Virus	Штамм Strain	Линия белых мышей White mouse line	Способ инфицирования Infection method	Инфицирующая доза, БОЕ Infectious dose, PFU	Симптомы заболевания Disease symptoms
Экстремелии Ectromelia	Hampstead	Аутобредные животные Autobred animals	Интраназально Intranasal	1 × 10 ⁶	Воспаление бронхов, альвеол, плевры Inflammation of the bronchi, alveoli, pleura
			Аэрозольно Aerosol	1 × 10 ⁶	Воспаление бронхов, альвеол, плевры Inflammation of the bronchi, alveoli, pleura
Вакцины Vaccines	WR	BALB/c	Интраназально Intranasal	1 × 10 ⁶	Бронхопневмония с проявлениями некроза Bronchopneumonia with manifestations of necrosis
Оспы коров Cowpox	Brighton	BALB/c	Аэрозольно Aerosol	5 × 10 ⁶	Бронхопневмония, ринит, синусит, менингит, экзантема Bronchopneumonia, rhinitis, sinusitis, meningitis, exanthema

Таблица 10. Результаты изучения морфологических изменений в тканях белых мышей линии BALB/c при интраназальном или аэрогенном инфицировании вирусом оспы коров, штамм Brighton [24]**Table 10.** Results of morphologic changes in tissues of white BALB/c mice during intranasal or aerogenic infection with cowpox virus, Brighton strain [24]

Ткани и органы Tissues and organs	Морфологические изменения Morphologic changes	Способ инфицирования Infection method	Наличие антигена вируса оспы коров в органах Presence of cowpox virus antigen in organs
Лёгкие, бронхи, бронхиолы, альвеолы Lungs, bronchi, bronchioles, alveoli	Воспаление, экзема, некроз, геморрагии, тельца включения Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Аэрозольно Aerosol	+
		Интраназально Intranasal	+
Бронхиоларные сосуды Bronchiolar vessels	Воспаление, некроз, дегенерация, тельца включения Inflammation, necrosis, degeneration, inclusion bodies	Аэрозольно Aerosol	+
Плевра Pleura	Воспаление Inflammation	Аэрозольно Aerosol	–
Трахея Trachea	Воспаление, экзема, некроз, тельца Inflammation, eczema, necrosis, corpuscles	Аэрозольно Aerosol	+
Назальный тракт Nasal tract	Воспаление, экзема, некроз, геморрагии, тельца включения Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Аэрозольно Aerosol	+
		Интраназально Intranasal	+
Гланды Glands	Воспаление, экзема, некроз, геморрагии, тельца включения Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Аэрозольно Aerosol	+
		Интраназально Intranasal	+
Соединительные ткани Connective tissues	Воспаление, геморрагии Inflammation, hemorrhages	Аэрозольно Aerosol	+
		Интраназально Intranasal	+
Протоки молочных желёз Mammary gland ducts	Воспаление, некроз, тельца включения Inflammation, necrosis, inclusion bodies	Аэрозольно Aerosol	–
			+
Назофарингеальные протоки Nasopharyngeal ducts	Воспаление, экзема, некроз, геморрагии, тельца включения Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Интраназально Intranasal	+
Евстахиева труба Eustathian pipe	Воспаление, тельца включения Inflammation, inclusion bodies	Интраназально Intranasal	+
Среднее ухо Middle ear	Воспаление, некроз, геморрагии, тельца включения Inflammation, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Аэрозольно Aerosol	+
		Интраназально Intranasal	–
Мышцы Muscles	Воспаление, некроз, тельца включения, регенерация тканей Inflammation, necrosis, inclusion bodies, tissue regeneration	Аэрозольно Aerosol	+
Костный мозг Bone marrow	Миелогенная гиперплазия Myelogenous hyperplasia	Аэрозольно Aerosol	–
		Аэрозольно Aerosol	+
Хвост, кожный покров Tail, skin	Воспаление, некроз, тельца включения, эпидермальная пролиферация Inflammation, necrosis, inclusion bodies, epidermal proliferation	Аэрозольно Aerosol	–
		Интраназально Intranasal	+

Примечание. + — выявление меченого вирусного антигена иммуногистологическим методом; – — отсутствие выявления меченого вирусного антигена.

Note. + — detection of labeled viral antigen by immunohistological method; – — No detection of labeled viral antigen.

мышей, аэрогенно инфицированных вирусом оспы коров [37] (табл. 11). На основании полученных результатов авторы исследования сделали вывод о том, что цидофовир при аэрозольном применении может быть эффективным при профилактике или экс-

тренной профилактике натуральной оспы или оспы обезьян.

Анализ представленных данных свидетельствует о том, что специалисты Министерства обороны США используют вирус оспы коров в качестве

Таблица 11. Результаты изучения противовирусной эффективности цидофовира при аэрозольном или подкожном введении белым мышам линии BALB/c аэрогенно инфицированных вирусом оспы коров, штамм Brighton, в дозе 5×10^6 БОЕ [37]

Table 11. Results of antiviral efficacy of cidofovir when administered by aerosol or subcutaneous injection to BALB/c white mice aerogenically infected with cowpox virus, Brighton strain, at a dose of 5×10^6 PFU [37]

Способ введения препарата Method of drug administration	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Срок введения препарата, сут Period of drug administration, day	Отношение выживших и инфицированных животных Ratio of surviving to infected animals	Доля выживших животных, % Percentage of surviving animals, %	<i>p</i>
Аэрозольно Aerosol	0,5–5,0	–2	8/10	80	< 0,05
		–1	9/10	90	< 0,05
		0	10/10	100	< 0,05
		+1	10/10	100	< 0,05
		+2	9/10	90	< 0,05
	0,06–0,50	–2	0/10	0	Н. д. N. d.
		–1	7/10	70	< 0,05
		0	10/10	100	< 0,05
		+1	9/10	90	< 0,05
		+2	7/10	70	< 0,05
Подкожно Subcutaneously	100	–2	7/10	70	< 0,05
		–1	7/10	70	< 0,05
		0	10/10	100	< 0,05
		+1	10/10	100	< 0,05
		+2	10/10	100	< 0,05
Плацебо Placebo		0	0/10	0	–

Примечание. –2 — введение цидофовира за 2 сут до инфицирования; 0 — введение цидофовира в день инфицирования; +2 — введение цидофовира через 2 сут после инфицирования. *p* — уровень надёжности различий по отношению к варианту опыта с введением плацебо. Н. д. — различия не достоверны.

Note. –2 — administration of cidofovir 2 days before infection; 0 — administration of cidofovir on the day of infection; +2 — administration of cidofovir 2 days after infection. *p* — reliability level of differences in relation to the experiment variant with placebo administration. N. d. — differences are not reliable.

модельного агента для проведения скрининговых испытаний и способов применения неспецифических медицинских средств защиты в отношении натуральной оспы. При обобщении результатов представленных работ можно сделать заключение о двойной направленности проводимых исследований. Так, можно констатировать, что сотрудниками USAMRIID проведено обоснование выбора вирусов оспы кроликов и оспы обезьян в качестве агентных имитаторов вируса натуральной оспы.

При этом данные, полученные в начале 2000-х гг., сопоставляются американскими военными специалистами с результатами, полученными в начале 1960-х гг. с использованием сухого агентного имитатора на основе вируса оспы кроликов [20]. По их мнению, вирус оспы кроликов может моделировать такие характеристики вируса натуральной оспы, как уровень репродукции в различных системах, в том числе в культурах клеток при суспензионном культивировании, устойчивость при переводе в аэрозоль. Величина ЛД₅₀ для кроликов при аэроген-

ном инфицировании достаточно низка (в отличие от других лабораторных животных при аэрогенном инфицировании другими ОПВ) [19].

При проведении аэриобиологических исследований особое внимание уделялось фракционно-дисперсному составу агентного имитатора. Для декларируемых авторами целей проводимых исследований такая конкретизация является явно излишней. В качестве инфицирующего препарата для данных исследований в большинстве работ сотрудников USAMRIID использована непосредственно культура штаммов вирусов оспы обезьян и оспы кроликов. По ряду косвенных признаков (состав жидкостей для пробоотбора, наличие в них различных концентраций пеногасителя, различная концентрация фекальной телячьей сыворотки) можно сделать вывод о том, что реально при проведении ряда аэриобиологических испытаний в качестве инфицирующего препарата были использованы вирусосодержащие материалы, полученные при выращивании возбудителя в суспензионной культуре клеток.

Выводы

Результаты аэриобиологических исследований с ОПВ свидетельствуют о заинтересованности военного ведомства США в проведении экспериментальных работ двойного назначения, включают мониторинг за свойствами ОПВ и возможное изменение их патогенности для человека, выбор оптимальных лабораторных моделей для изучения свойств ОПВ и возможности моделирования свойств вируса натуральной оспы при использовании других ОПВ (вирусы оспы коров, оспы кроликов, оспы обезьян), моделирование основных характеристик заболевания, вызываемого вирусом натуральной оспы, у человека и оценка эффективности имеющихся и вновь разрабатываемых вакцин против натуральной оспы, сравнительное изучение эффективности противовирусных лекарственных средств для профилактики или экстренной профилактики натуральной оспы и оспы обезьян.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Щелкунов С.Н. Биотерроризм как национальная и глобальная угроза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000;(6):83–5. Onishchenko G.G., Sandkhchiev S., Netesov S.V., Shchelkunov S.V. Bioterrorism: national and global threats. *Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*. 2000;(6):83–5. EDN: <https://elibrary.ru/mpewxn>
2. Онищенко Г.Г., ред. *Противодействие биологическому терроризму: практическое руководство по противоэпидемическому обеспечению*. М.;2003. Onishchenko G.G., ed. *Countering Biological Terrorism: A Practical Guide to Anti-Epidemic Provision*. Moscow;2003.
3. Wallin A., Luksiene Z., Zagminas K., Surkiene G. Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas)*. 2007;43(4):278–84.
4. Riccardo V., Pablo G.C. Neutralization determinants on Poxviruses. *Viruses*. 2023;15(12):2396. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15122396>
5. Bruneau R.C., Tazi L., Rothenburg S. Cowpox viruses: a zoo full of viral diversity and lurking threats. *Biomolecules*. 2023;13(2):325. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13020325>
6. Esposito J.J., Palmer E.L., Borden E.C., et al. Studies on the poxvirus Cotia. *J. Gen. Virol.* 1980;47(1):37–46. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-47-1-37>
7. Ueda Y., Dumbell K.R., Tsuruhara T., Tagaya I. Studies on Cotia virus an unclassified poxvirus. *J. Gen. Virol.* 1978;40(2):263–76. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-40-2-263>
8. Van Bresse M.F., Van Waerebeek K., Reyes J.C., et al. Evidence of poxvirus in dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*) and Burmeister's porpoise (*Phocoena spinipinnis*) from coastal Peru. *J. Wildl. Dis.* 1993;29(1):109–13. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-29.1.109>
9. Campos R.K., Brum M.C., Nogueira C.E., et al. Assessing the variability of Brazilian vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.* 2011;156(2):275–83. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0857-z>
10. Abrahão J.S., Silva-Fernandes A.T., Lima L.S., et al. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16(6):976–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1606.091187>
11. Щелкунов В.Н. Возможен ли возврат оспы? *Молекулярная медицина*. 2011;(4):36–41. Shchelkunov S.N. Whether re-emergence of smallpox could be? *Molecular Medicine*. 2011;(4):36–41. EDN: <https://elibrary.ru/ohfurl>
12. Пальцев М.А., Зверев В.В., Гинцбург А.Л. и др. Натуральная оспа – дремлющий вулкан. *Вопросы вирусологии*. 2008;53(4):1–9. Paltsev M.A., Zverev V.V., Gintsburg A.L. Smallpox is a dormant volcano. *Problems of Virology*. 2008;53(4):1–9. EDN: <https://elibrary.ru/jtftat>
13. Борисевич С.В., Маренникова С.С., Стомба Л.Ф. и др. Вакциноподобные вирусы: особенности циркуляции в Южной Америке. *Вопросы вирусологии*. 2014;59(2):10–4. Borisevich S.V., Marennikova S.S., Stovba L.F., et al. Vaccine-like viruses: peculiarities of circulation in the South America. *Problems of Virology*. 2014;59(2):10–4. EDN: <https://elibrary.ru/sbkmvh>
14. Hahn N. Smallpox and related poxvirus infection in the simian host. *Bacteriol. Rev.* 1961;25(4):459–76. DOI: <https://doi.org/10.1128/br.25.4.459-476.1961>
15. Smith D.F. Progress in the discovery of compounds inhibiting orthopoxviruses in animal model. *Antivir. Chem. Chemother.* 2008;19(3):115–24. DOI: <https://doi.org/10.1177/095632020801900302>
16. Chapman J.L., Nichols D.K., Martinez M.J., Raymond J.W. Animal models of orthopoxvirus infection. *Vet. Pathol.* 2010;47(5):852–70. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985810378649>
17. Boulter E.A., Westwood J.C., Maber H.B. Value of serotherapy in a virus disease (rabbit pox). *Lancet*. 1961;2(7210):1012–5. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(61\)90969-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(61)90969-2)
18. Hartings J.M., Roy C.J. The automated bioaerosol exposure system: preclinical platform development and a respiratory application with nonhuman primates. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2004;49(1):39–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2003.07.001>
19. Nalca A., Nichols D.K. Rabbitpox: a model of airborne transmission of smallpox. *J. Gen. Virol.* 2011;92(Pt. 1):31–5. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.026237-0>
20. Bedson H.S., Duckworth M.J. Rabbitpox: an experimental study of the pathway of infection in rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.* 1963;85:1–20.
21. Nicas M., Hubbard A.E., Jones R.M., Reingold A.L. The infection dose of Variola (Smallpox) virus. *Appl. Biosaf.* 2004; 9(3):118–27.
22. Roy C.J., Voss T.G. Use of the aerosol rabbitpox virus model for evaluation of anti-poxvirus agents. *Viruses*. 2010;2(9):2096–107. DOI: <https://doi.org/10.3390/v2092096>
23. Garsa N.L., Hatkin J.M., Livingston V., et al. Evaluation of efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) IMVAMUNE against aerosolized rabbitpox virus in a rabbit model. *Vaccine*. 2009;27(40):5496–504. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.105>
24. Martinez M.J., Bray M.P., Huggins J.W. A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000;124(3):362–77. DOI: <https://doi.org/10.5858/2000-124-0362-ammoat>
25. Roy C.J. Rabbitpox: an aerosol model for study of aerosolized poxviruses. *J. Antivir. Res.* 2004;43:34–7.
26. *Процедурный доклад Специальной группы государств-участников Конвенции о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсического оружия и об их уничтожении*. Женева;1999. Procedural report of the Ad Hoc Group of States Parties to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxic Weapons and on Their Destruction. Geneva;1999.
27. Zaucha G.M., Jahrling P.B., Geisbert T.W., et al. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Lab. Invest.* 2001;81(12):1581–600. DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780373>

ОБЗОРЫ

28. Nalca A., Livingston V.A., Garza N.L., et al. Experimental infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) with aerosolized monkeypox virus. *PLoS One*. 2010;5(9):e12880. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012880>
29. Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., et al. Exploring the potential variola virus infection of *Cynomolgus macaques*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004;101(42):15196–200. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0405954101>
30. Grant R.J., Baldwin C.D., Nalca A., et al. Application of the ibis T5000 panorthopoxvirus assay to quantitatively detect monkeypox viral loads in clinical specimens from macaques, experimentally infected with aerosolized monkeypox virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010;82(2):318–23. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0361>
31. Barnewall R.E., Fisher D.A., Robertson A.B., et al. Inhalation monkeypox virus infection in cynomolgus macaques. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012;2:117. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00117>
32. Hatch G.J., Graham V.A., Bewley K.R., et al. Assessment of protective effect of Imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in cynomolgus macaques. *J. Virol.* 2013;87(14):7805–15. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.03481-12>
33. Keasey S., Pugh C., Tikhonov A., et al. Proteomic basis of the antibody response to monkeypox virus infection examined in *Cynomolgus macaques* and a comparison to human smallpox vaccination. *PLoS One*. 2010;5(12):e15547. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015547>
34. Stittelaar K.J., van Amerongen G., Kondova I., et al. Modified vaccinia virus Ankara protects macaques respiratory challenge with monkeypox. *J. Virol.* 2005;79(12):7845–51. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.79.12.7845-7851.2005>
35. Bray M., Martinez M., Smee D.F., et al. Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *J. Infect. Dis.* 2000;181(1):10–9. DOI: <https://doi.org/10.1086/315190>
36. Bray M., Martinez M., Kefauver D., et al. Treatment of aerosolized cowpox virus infection in mice with aerosolized cidofovir. *Antiviral Res.* 2002;54(3):129–42. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(01\)00220-0](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(01)00220-0)
37. Roy C.J., Baker R., Washburn K., Bray M. Aerosolized cidofovir is retained in the respiratory tract and protect mice against intranasal cowpox virus challenge. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2003;47(9):2933–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.47.9.2933-2937.2003>

Информация об авторах

Онищенко Геннадий Григорьевич — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. каф. экологии человека и гигиены окружающей среды ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0135-7258>

Кириллов Игорь Анатольевич, канд. воен. наук, начальник войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5001-3326>

Борисевич Сергей Владимирович[✉] — д.б.н., профессор, академик РАН, начальник 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, 48cniil@mil.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Сизикова Татьяна Евгеньевна — к.б.н., с.н.с. научно-исследовательского отдела 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Кротков Виктор Тимофеевич — к.м.н., с.н.с. научно-исследовательского отдела 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>

Участие авторов: Онищенко Г.Г., Кириллов И.А. — разработка концепции статьи, обобщение полученных данных; Борисевич С.В. — сбор и анализ данных, обобщение полученных данных, редактирование текста статьи, утверждение окончательного варианта статьи; Сизикова Т.Е. — сбор и анализ данных, формирование текста статьи; Кротков В.Т. — оценка полученных данных. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 11.04.2024;
принята к публикации 08.06.2024;
опубликована 29.06.2024

Information about the authors

Gennadiy G. Onishchenko — D. Sci. (Med.) Professor, RAS Full Member, Head, Department of human ecology and environmental hygiene, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0135-7258>

Igor A. Kirillov — Cand. Sci. (Military), Chief, Nuclear, Biological and Chemical Protection Troops of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5001-3326>

Sergey V. Borisevich[✉] — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Head, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, 48cniil@mil.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Tatiana E. Sizikova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Victor T. Krotkov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad-6, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>

Author contribution: Onishchenko G.G., Kirillov I.A. — development of the concept of the article, generalization of the data obtained; Borisevich S.V. — collection and analysis of data, summarizing the data obtained, editing the text of the article, approval of the final version of the article; Sizikova T.E. — collection and analysis of data, formation of the text of the article; Krotkov V.T. — evaluation of the data obtained. 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 11.04.2024;
accepted for publication 08.06.2024;
published 29.06.2024

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-486>

Технология получения моноклональных антител. 50 лет развития

Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н.[✉], Сегал О.Л., Печелюлько А.А., Яковлева Д.А., Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д.

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

Аннотация

Моноклональные антитела широко используются во всех областях биологии и медицины. Появление и развитие технологии их получения произвело революцию в иммунологии и позволило создать не только новые методы диагностики, но и множество эффективных лекарственных препаратов. **Целью** нашего обзора стали анализ и обобщение актуальных данных, затрагивающих технологию получения моноклональных антител. Нами проведён анализ информации из 70 современных источников литературы, посвящённых различным методам их получения, в том числе классической гибридомной технологии. В настоящей работе мы попытались охватить весь спектр методов, используемых для получения моноклональных антител.

Ключевые слова: моноклональные антитела, гибридомная технология, рекомбинантная ДНК, рекомбинантные антитела, фаговый дисплей, вирус Эпштейна–Барр, NGS, CRISPR/Cas9, вирус гепатита С

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: Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н., Сегал О.Л., Печелюлько А.А., Яковлева Д.А., Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д. Технология получения моноклональных антител. 50 лет развития. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):412–427.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-486>

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

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-486>

Monoclonal antibody techniques. 50 years of development

Yulia S. Massino, Yulia N. Tarakanova[✉], Olga L. Segal, Anastasia A. Pechelyulko, Dinora A. Yakovleva, Maria V. Lichutina, Dmitriy A. Dmitriev, Alexander D. Dmitriev

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

Abstract

Monoclonal antibodies are widely used in all fields of biology and medicine. The emergence and development of the technology for their production revolutionized immunology and allowed the creation of not only new diagnostic methods, but also many effective drugs. The **purpose** of our review is to analyze and summarize relevant data concerning the technology of obtaining monoclonal antibodies. We have analyzed information from 70 modern literary sources devoted to various methods of obtaining them. In this review, we tried to cover the entire range of methods used to obtain monoclonal antibodies today.

Keywords: monoclonal antibodies, hybridoma technology, recombinant DNA, recombinant antibodies, phage display, Epstein–Barr virus, NGS, CRISPR/Cas9, hepatitis C virus

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: Massino Yu.S., Tarakanova Yu.N., Segal O.L., Pechelyulko A.A., Yakovleva D.A., Lichutina M.V., Dmitriev D.A., Dmitriev A.D. Monoclonal antibody techniques. 50 years of development. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):412–427.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-486>

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

Введение

Одним из самых выдающихся изобретений XX в. в области биологических наук и биотехнологий по праву считается метод получения моноклональных антител (МКА) с помощью гибридизации соматических клеток, за который его авторам — С. Milstein и G. Köhler — в 1984 г. была вручена Нобелевская премия. До изобретения в конце 1970-х гг. гибридной технологии (ГТ) исследователям в основном были доступны поликлональные антитела (ПКА), выделяемые из сыворотки крови человека или животных¹. Такие ПКА, даже после их аффинной очистки, являются смесями молекул иммуноглобулинов, образованных разными В-лимфоцитами. Они отличаются и по структуре своих вариабельных участков, ответственных за связывание с антигеном, и по специфичности к различным эпитопам антигена. Причём партии ПКА, полученные от разных доноров, имеют различный состав и иммунохимические характеристики (в отношении специфичности и аффинности). ГТ, являющаяся блестящим практическим подтверждением клонально-селекционной теории гуморального иммунитета, позволяет в неограниченном количестве получать потомство индивидуальных В-лимфоцитов, секретирующих антитела, направленные к индивидуальному эпитопу на молекуле антигена, — МКА [1].

Появление гибридной технологии

Процесс получения МКА по ГТ, как он был описан G. Köhler и С. Milstein, в общих чертах сводится к следующим основным этапам:

1. Иммунизация животного (лабораторной мыши) антигеном.

2. Гибридизация (после получения иммунного ответа) лимфоцитов селезёнки мыши с помощью специального сливающего агента, например, вируса Сендай или полиэтиленгликоля (ПЭГ), с клетками миеломы мыши, несущей генетический дефект — мутацию гена, кодирующего фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу, что приводит к утрате так называемого «запасного» пути синтеза нуклеотидов.

3. Селекция полученной после слияния смеси клеток на культуральных планшетах с ростовой средой, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (так называемая среда ГАТ) для отбора гибридных клеток. Среда ГАТ содержит аминоптерин, блокирующий основной путь синтеза нуклеотидов, на ней могут выживать только клетки, способные использовать «запасной» путь. Поэтому родительские клетки миеломы на этой среде гибнут. В-лим-

фоциты и другие клетки селезёнки мыши являются короткоживущими (в отличие от миеломных клеток) и также быстро гибнут при культивировании *in vitro*. В результате вырастают только колонии гибридных клеток, среди которых есть потомки гибридов от слияния В-лимфоцитов (продуцирующих МКА к антигену) и клеток миеломы. Таким образом, эти В-лимфоциты получают «бессмертие» от злокачественных клеток миеломы.

4. Тестирование выросших колоний гибридных клеток на способность секретировать в культуральную среду МКА к антигену.

5. Неоднократный процесс клонирования отобранных гибридом — продуцентов МКА с целью получить чистую клеточную линию, состоящую из клеток — потомков одного-единственного В-лимфоцита, обретшего «бессмертие» за счёт слияния с клеткой миеломы.

6. В результате примерно через 5–6 мес после слияния получают клонированные гибридные клеточные линии, которые могут размножаться в больших количествах (при сохранении части клеток в жидком азоте) и служить нескончаемым источником однородных МКА.

Изобретению описанной технологии предшествовал ряд достижений в области клеточной биологии. В частности, 1960–1970-е гг. — это время развития генетики соматических клеток, в которое адаптировали методы, ранее разработанные в области генетики бактерий и вирусов, для использования с культивируемыми клетками млекопитающих — как нормальными клетками первичных культур, так и злокачественными (трансформированными) клеточными линиями. Были разработаны методы гибридизации соматических клеток и получен ряд генетически маркированных клеточных линий, использование которых в гибридизации позволило проводить отбор гибридов с помощью специальных селективных сред. Самой первой селективной системой (в дальнейшем оказавшейся и наиболее применяемой) была среда ГАТ, изобретенная в 1962 г. Вацлавом и Элизабет Шибальскими². Дж. Литтлфилд в 1964 г. описал успешное использование среды ГАТ для отбора гибридов соматических клеток³. Впервые для отбора гибридов после соматической гибридизации среду ГАТ применил Дж. Литтлфилд в 1964 г. [2]. В тот же период происходит широкое внедрение методов дифференциальной окраски хромосом, позволяющей детально изучать закономерности изменения хромосомного состава соматических гибри-

¹ Глуханюк Е., Горяйнова О. Краткая история открытия и применения антител. Биомолекула. 2018. URL: <https://biomolecula.ru/articles/kratkaia-istoriia-otkrytiia-i-primeneniia-antitel> (дата обращения: 11.06.2024).

² Szybalska E.H., Szybalski W. Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1962;48(12):2026–2034.

³ Littlefield J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science*. 1964;145:709–710.

ных клеток, часто отличающихся нестабильностью кариотипа (особенно при слиянии соматических клеток разных видов животных или животных и человека) [2]. С. Milstein, которого называют «отцом гибридной технологии» [3], в течение ряда лет изучал экспрессию иммуноглобулинов в культурах клеток, в том числе используя методы соматической гибридизации [2]. И эти исследования, конечно, послужили важным подготовительным этапом к выдающемуся изобретению по получению секретирующих МКА клеточных линий (названных «гибридомом»), сделанному С. Milstein вместе с работавшим в его лаборатории немецким иммунологом G. Köhler.

Большой заслугой С. Milstein перед международным научным сообществом оказалось и то, что это изобретение не было им запатентовано. Метод был описан в открытой научной публикации (к разочарованию Маргарет Тэтчер, тогдашнего премьер-министра Британии, озабоченной финансовыми интересами британской биотехнологии), и, более того, Мильштейн позволил использовать полученную им линию клеток миеломы мыши X-63 и в других лабораториях для внедрения гибридной технологии [1]. Атмосфера тех лет в биологической науке на Западе была более свободна от давления интересов коммерции, и считалось важным в интересах развития науки оставлять научные достижения в свободном доступе для широких кругов учёных.

В результате ГТ стала быстро распространяться в разных странах. В частности, в 1970–1980-е гг. в ряде научных центров СССР (например, в лаборатории иммунохимии Всесоюзного онкологического научного центра, возглавляемой известным иммунохимиком Г.И. Абелевым, и др.) также начинают активно развиваться ГТ с использованием линии миеломы мыши X-63, щедро предоставленной С. Milstein. Некоторые из авторов этого обзора также получили в этот период свои первые гибридомы, работая на базе Всесоюзного научного центра психического здоровья [4].

Разработка гибридного метода примерно совпала по времени с таким важным достижением в области иммунохимии, как изобретение метода иммуноферментного анализа [5]. Все эти направления быстро соединились, дав мощный импульс развитию биотехнологической индустрии по производству разнообразных МКА и основанных на них тест-систем (с различным дизайном) для исследовательских и диагностических целей (в том числе для диагностики инфекций, опухолевых маркеров и др.) [5].

Вместе с тем с самого начала изобретения ГТ у исследователей было стремление применить её для получения терапевтических МКА, которые можно было бы использовать при лечении рака и других опасных заболеваний. С МКА связывались большие надежды, как с некими «волшебными пулями».

В 1986 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило первое терапевтическое МКА (Muromonab-CD3). Это мышинное МКА предназначено для снижения реакции отторжения при трансплантации почек [6].

К сожалению, за первым энтузиазмом вскоре последовало разочарование. Мышиные МКА, полученные с помощью ГТ, давали сильную иммунную реакцию при введении в организм человека, и их эффективность быстро подавлялась. У них также был относительно короткий период полувыведения по сравнению с человеческим IgG (вследствие слабого связывания с человеческим FcRn-рецептором). Наконец, мышинные МКА проявляют слабую способность вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность и комплементзависимую цитотоксичность при введении в организм человека, что снижает эффективность мышинных МКА, особенно при онкологических показаниях к их применению [7]. Даже стали раздаваться голоса скептиков, сомневающихся, что МКА окажутся полезными для широкого применения в медицине в качестве лекарственных препаратов [6].

Рекомбинантные антитела и методы их получения

Однако в результате эти первые неудачи только послужили стимулом к важным усовершенствованиям в области ГТ. В частности, для преодоления проблем, связанных с иммуногенностью мышинных МКА, привлекли технологии рекомбинантных ДНК [8–10]. Оказалось, что если с помощью методов генной инженерии у мышинных МКА заменить константные участки лёгких и тяжёлых цепей на тактовые IgG человека, то проблема с иммуногенностью во многом преодолевается. Такие МКА получили название «химерных». Ещё менее иммуногенными могут быть так называемые «гуманизированные МКА», у которых от исходных мышинных МКА остаются только гипервариабельные участки CDR (complementarity determining regions — области молекулы иммуноглобулина, определяющие её комплементарность к антигену), а все остальные части молекулы соответствуют IgG человека. Генетические конструкторы, соответствующие МКА с такой изменённой структурой, можно экспрессировать в культуре клеток, для чего часто используют линию клеток яичников китайского хомячка СНО и некоторые другие линии. После трансформации клеток векторами, включающими гены рекомбинантных МКА, такие культуры сами становятся «фабриками» по производству МКА (наподобие гибридных клеточных линий)⁴. По данным за 2022 г., в

⁴ Ясный И. Биотехнология антител. Биомолекула. 2018. URL: <https://biomolecula.ru/articles/biotekhnologiya-antitel> (дата об-

мире насчитывалось 162 МКА, одобренных для терапевтического применения по крайней мере одним регулятором (включая 112 МКА, одобренных FDA и 114 МКА, одобренных в Европе) [11]. Значительная доля этих МКА по своему происхождению являются рекомбинантными антителами (химерными или гуманизированными), производными мышиных гибридомных МКА [6, 10].

И это далеко не единственное усовершенствование методов получения МКА, известное в настоящее время. Условно эти усовершенствования можно разделить на две большие категории. К первой группе относятся технологические усовершенствования, которые вносятся в «старую» («классическую») ГТ, восходящую к изобретению С. Milstein и G. Köhler. Ко второй группе относятся такие технологии получения МКА, которые отошли от собственно создания гибридом и основаны на иных принципах. Ниже будут сначала кратко рассмотрены эти «негибридомные» методы, с тем чтобы потом снова вернуться к ГТ.

Фаговый дисплей

Из таких «негибридомных» методов прежде всего следует упомянуть метод «фагового дисплея», разработанный несколько лет спустя изобретения гибридом [9, 12, 13]. За это изобретение его авторы G.P. Smith и G.P. Winter в 2018 г. получили Нобелевскую премию. Собственно, этот метод позволяет получать не только МКА, но вообще специфичные рецепторы к лигандам (или, наоборот, лиганды к рецепторам). Впервые этот подход был описан G.P. Smith в 1985 г. А в начале 1990-х годов G.P. Winter и соавт. использовали его для получения МКА [14]. В применении к получению МКА суть этого метода в общих чертах состоит в следующем. Из В-лимфоцитов, например, человека, выделяют мРНК и синтезируют кДНК, кодирующую лёгкие и тяжёлые цепи переменных участков антител (V_L и V_H). Эту кДНК встраивают в экспрессирующий вектор на основе нитевидного фага M13 в соединении с участком, кодирующим поверхностный белок фага. При этом в геноме фагового вектора кодирующие последовательности V_L и V_H комбинируются в пары случайным образом. При молекулярном клонировании путём заражения полученным фаговым вектором бактериальных клеток в них формируются вирусные частицы, на поверхности которых собираются Fab-фрагменты антител (отсюда название метода — «фаговый дисплей»). Далее частицы фагов выделяют из бактерий, и из множества фагов производят отбор тех вариантов, которые экспрессируют на своей поверхности Fab-фрагменты, специфичные к избранному антигену. Для этого фаговые частицы вводят в соприкосновение с анти-

геном, прикреплённым к твёрдой фазе (например, к пластиковой поверхности). Если на поверхности фага представлены Fab-фрагменты, специфичные к антигену, такой фаг прикрепится к антигену, в противном случае он просто будет удалён с поверхности при отмывке. Отобранные частицы фагов можно снова размножить в бактериях и повторить селекцию на антигене. В результате отбирают клон фаговых частиц, несущих высокоаффинные Fab-фрагменты на своей поверхности и, соответственно, содержащие в своем геноме кодирующие их гены [9, 12, 13]. Как сказал G.P. Smith в своей речи при вручении Нобелевской премии, «эта искусственная селекция в чашке Петри очень похожа на естественную эволюцию»⁵; видимо, он имел в виду процесс естественного отбора (при котором через фенотип отбирается генотип).

На следующем этапе с помощью ПЦР и других технологий рекомбинантных ДНК можно получить векторы для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих отобранные Fab-фрагменты, в клетках СНО (или других клеточных линий) для наработки (в том числе в больших количествах, в биореакторах) рекомбинантных МКА в формате Fab-фрагментов. Или, в зависимости от задач, можно создать рекомбинантные конструкторы, позволяющие экспрессировать МКА той же специфичности, но в формате Fab₂-фрагментов или целых молекул IgG человека. Также технологию фагового дисплея используют и для получения одноцепочечных (single chain) фрагментов переменных участков (scFv). Таким образом, метод фагового дисплея в сочетании с другими технологиями геной инженерии в конечном счете позволяет получать разнообразные рекомбинантные МКА [9, 13].

Важно, что метод фагового дисплея теоретически позволяет преодолевать ряд ограничений, связанных с ГТ. Например, он позволяет получать МКА к высокотоксичным антигенам, т. к. он не требует иммунизации животных, или к слабо иммуногенным антигенам, к которым не вырабатывается гуморального ответа в организме. С другой стороны, для создания изначальной геной библиотеки антител можно использовать антитела иммунного донора, чтобы увеличить вероятность отбора антител нужной специфичности, или, наоборот, искусственно созданные (синтетические) библиотеки нуклеотидных последовательностей для повышения разнообразия представленных дисплеем вариантов V_L/V_H пар. В настоящее время этот метод также претерпел развитие, в частности, в качестве «дисплея» используют не только фаги, но и бактерии, дрожжи и даже клетки млекопитающих (что представляет

⁵ Smith G.P. Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish. Nobel Lecture. 2018. URL: <https://nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/smith/lecture/> (дата обращения: 11.06.2024).

дополнительные возможности с точки зрения формата представляемых на поверхности клеток молекул [9, 15, 16]. По данным на 2022 г. уже успешно прошли клинические испытания и получили одобрение для использования в терапии (аутоиммунных и онкологических заболеваний) 17 МКА, полученных с использованием метода дисплея [16, 17]. Много таких МКА находятся в стадии изучения и клинического испытания, среди них особо следует отметить МКА, обладающие широкой нейтрализующей способностью в отношении вируса иммунодефицита человека [17].

Методы получения моноклональных антител из индивидуальных В-клеток

Другое активно развивающееся в настоящее время направление, не относящееся непосредственно к ГТ, — это получение МКА из индивидуальных В-клеток. Оно существует в различных модификациях, будучи тесно связанным также с методами генетической инженерии [18, 19]. С этим направлением связаны большие надежды в отношении получения нейтрализующих антител широкого спектра (broadly neutralizing antibodies — bNAbs) для терапии опасных инфекционных болезней, таких как инфекция вирусом иммунодефицита человека, вирусный гепатит С и др. [18–21]. Ниже описаны некоторые примеры таких методов, часто упоминаемые в публикациях.

1. Культивирование отдельных В-лимфоцитов. В последние годы были разработаны методы, позволяющие поддерживать выживание и размножение В-лимфоцитов в культуре существенно дольше, чем это было возможно ранее. В частности, В-лимфоциты из клеток крови могут жить, размножаться и секретировать антитела в течение определённого времени при культивировании вместе со специальными «кормящими» (фидерными) клетками, экспрессирующими стимулирующую В-клетки молекулу — лиганд CD40 (CD40L) и в присутствии некоторых цитокинов в культуральной среде (например, интерлейкина-21) [18, 19, 22].

Для предотвращения роста самих фидерных клеток (что может мешать выживанию В-лимфоцитов) их подвергают облучению или воздействию цитостатиков (например, митомицина) [22]. Описано несколько протоколов таких методов, включая использование трансфицированных фидерных клеток, способных экспрессировать CD40L и интерлейкины, необходимые для стимуляции В-лимфоцитов [22, 23]. Показано, что В-клетки, активированные *in vitro* с помощью CD40L и интерлейкинов, не только пролиферируют, но в них запускается активный синтез антител. Антитела, продуцируемые такими лимфоцитами, можно выявить в культуральной среде и изучать их свойства (например, нейтрализи-

рующую способность в отношении вирусов и др.). Более того, поскольку синтез антител сопровождается повышением уровня мРНК, кодирующей Ig, это упрощает амплификацию и последующее секвенирование генов Ig из единичных В-клеток. Поэтому стимулированные *in vitro* лимфоциты рассматриваются как «удобные объекты для определения полных последовательностей ДНК, сопряжённых лёгких и тяжёлых цепей Ig и для создания на их основе новых человеческих моноклональных антител» [22].

Некоторые фирмы предлагают наборы для культивирования В-клеток, включающие специально обработанные фидерные клетки⁶. Предпринимаются также усилия по дальнейшему усовершенствованию подобных систем путём создания 3D-моделей лимфоидных органов. Показано, что такие 3D-клеточные модели (основанные, например, на использовании синтетических гелей в качестве матрикса) могут ещё больше поддерживать выживаемость и пролиферацию В-лимфоцитов человека (имитируя формирование зародышевых центров лимфоидных органов), а также усиливать функциональную дифференцировку В-клеток памяти в секреторирующие антитела В-лимфоциты [24]. Важно, что одновременно в тех же культурах наблюдали и дифференцировку наивных В-клеток в секреторирующие антитела лимфоциты, причём с переключением изотипов антител. Предполагается, что дальнейшая оптимизация подобных 3D-культур может предоставить возможность воспроизведения *in vitro* и таких процессов, характерных для зародышевых центров лимфоидных органов, как возрастание аффинности антител в отношении специфического антигена по механизму гипермутагенеза [24].

2. Получение В-клеток, продуцирующих МКА, с помощью приборов для флуоресцентной клеточной сортировки (варианта проточной цитометрии), или, применяя другую терминологию, — метода «сортировки флуоресцентно-активированных клеток» (Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS). Этот подход основан на том, что на поверхности В-лимфоцитов, относящихся к клеткам памяти, содержатся рецепторы той же специфичности, что и антитела, которые эта клетка способна секретировать после её активации антигеном. На практике метод состоит примерно в следующем: В-клетки памяти (специально выделенные или находящиеся в составе мононуклеарных клеток крови) приводятся в соприкосновение с антигеном, несущим флуоресцентную метку, и с помощью прибора для флуоресцентной клеточной сортировки («клеточ-

⁶ APEX BIO. Human B Cell Culture and Expansion Kit. Catalog No. BC1001. URL: <https://apexbt.com/human-b-cell-culture-and-expansion-kit.html> (дата обращения: 11.06.2024).

ного сортера») отбираются только те клетки, которые связали антиген своими поверхностными В-клеточными рецепторами (BCR), специфичными к данному антигену. Клеточный сортер распределяет отобранные клетки в лунки микропланшета. Далее тактика может быть разной. ДНК клеток может непосредственно использоваться для получения рекомбинантных МКА (причём с сохранением с помощью специального линкора данного ценного индивидуального сочетания V_L и V_H), или В-клетки могут какое-то время культивироваться, чтобы лучше изучить секретируемые ими МКА, например, в отношении их нейтрализующей способности (если исследование связано с поиском антител к патогенным вирусам) [18, 19].

Однако одна из сложностей, возникающих при использовании указанных методов культивирования В-лимфоцитов *in vitro*, заключается в том, что чем эффективнее происходит стимуляция В-лимфоцитов, тем быстрее они превращаются в терминально дифференцированные плазматические клетки, не способные к дальнейшему росту [22]. В работе М.Ж. Kwakkenbos и соавт. удалось преодолеть эту сложность путём генетического перепрограммирования В-лимфоцитов (взятых из крови донора) [25]. С помощью ретровирусной трансдукции в лимфоциты переносили гены, кодирующие транскрипционные факторы BCL-6 и BCL-XL, которые играют важную роль в поддержании размножения В-клеток в зародышевых центрах. В результате В-лимфоциты приобретали способность размножаться, образовывать клоны и секретировать МКА по крайней мере в течение месяца, в присутствии стимулирующего фидера. Кроме того, у них обнаруживали экспрессию фермента активационнозависимой цитидиндезаминазы, обеспечивающей соматический гипермутационный процесс при созревании аффинности антител в зародышевых центрах [25]. Важно, что трансдуцированные лимфоциты (например, В-клетки памяти, выделенные из крови доноров, иммунизированных столбнячным анатоксином), не только секретировали антитела, но и сохраняли на своей поверхности BCR. Это позволило применить флуоресцентный клеточный сортер для обнаружения В-лимфоцитов, продуцирующих МКА к столбнячному токсину, и получить клоны В-лимфоцитов, секретирующие МКА к данному антигену. Авторы показали, что с помощью описанного подхода можно получать МКА с нейтрализующей активностью к вирусам (например, к респираторно-синцитиальному вирусу и др.) [25]. Метод можно использовать для получения не только МКА человека, но и разных видов млекопитающих.

Ещё одна часто используемая возможность для получения потомства индивидуальных В-клеток человека — это иммортализация В-клеток с помощью вируса Эпштейна–Барр (EBV) для получения

трансформированных (лимфобластоидных) клеточных линий, которые можно дополнительно стабилизировать путём слияния с клетками миеломы человека или гибридной линии (полученной от слияния клеток миеломы человека с миеломой мыши) [18, 26]. Подробнее об этом подходе, который отчасти снова возвращается к ГТ для получения МКА человека, будет сказано ниже.

Микрожидкостные технологии при получении моноклональных антител

Технологии получения МКА из единичных В-клеток в настоящее время используются в двух вариантах: макрварианте (с обычным лабораторным оборудованием для культивирования клеток) и микроварианте, основанном на микрожидкостных (микрофлюидных) технологиях [18]. Макрварианты в общих чертах описаны выше. Микрожидкостные технологии существуют в разных форматах, сначала описанных в научных статьях в качестве изобретений научных лабораторий, но теперь ряд зарубежных биотехнологических компаний уже специализируется на выпуске такого оборудования. Один из вариантов технологий для отбора В-клеток человека, секретирующих МКА, сводится примерно к следующему. Взвесь клеток, потенциальных продуцентов МКА, в жидкой среде запускается в микрожидкостную камеру прибора. Туда же вносится специальный масляный раствор. При смешивании в микроканалах прибора взвеси клеток с маслом образуются водно-масляные микрокапли (по размеру соответствующие пико- и нанообъёмным частицам), которые включают внутри себя В-клетку. Капли стабилизируют поверхностно-активным веществом (сурфактантом). Кроме того, внутрь капли помещают реактивы, представляющие собой частицы, покрытые антигеном, и антитела к Ig человека, связанные с флуоресцентной меткой (микрофлюидные технологии позволяют производить различные манипуляции с такими каплями, варьируя их размер и содержимое). Если клетка продуцирует специфические антитела, то они прикрепятся к поверхности частицы с антигеном, а к ним присоединятся уже меченые флуоресцентные антитела, т. е. поверхность наночастицы, находящейся внутри микрокапли, покроется иммунными комплексами: антиген-специфические МКА–вторые антитела с флуоресцентной меткой. В этом случае от наночастицы будет исходить свечение, т. е. внутри капли возникнет светящаяся точка. Встроенный в прибор клеточный сортер отберёт такие микрокапли и распределит их по нанолункам специального культурального микропланшета (с лунками очень малых объёмов). В лунках капли лопаются от соприкосновения с культуральной средой, и клетка оказывается в среде, где может какое-то время расти и делиться. Далее среда может быть дополнительно

проверена на наличие секретированных МКА, которые могут накапливаться в высоких концентрациях, благодаря миниатюрным размерам лунок. Технология позволяет за несколько часов анализировать десятки миллионов В-клеток, находящихся в образце [18, 27, 28].

Некоторые микрожидкостные системы, выпускаемые биотехнологическими компаниями, используют для детекции не флуоресценцию на наночастицах, а явление, известное как «резонансный перенос энергии по Фёрстеру» (Forster Resonance Energy Transfer) или, по другой терминологии, «индуктивно резонансный перенос энергии». Он предполагает наличие в реакционной смеси двух белковых молекул, несущих разные флуоресцентные метки, называемые флуорофорами, одна из которых может испускать энергию (являться донором), а другая — поглощать её (служить акцептором) при сближении молекул меченых белков. Если в микрокапле вместе с В-клеткой из крови человека, секретирующей антитела класса IgG, содержатся меченные разными флуорохромами молекулы антигена и вторых антител (к IgG человека), то при образовании иммунных комплексов (меченные флуорохромом антиген-специфические антитела к антигену — вторые антитела, меченные другим флуорохромом) донорные и акцепторные молекулы сближаются, происходит испускание энергии донорской молекулой и изменение свечения молекулы акцептора, что улавливается прибором [29].

Дальнейшие манипуляции с инкапсулированными в микрокапли В-лимфоцитами (секретирующими нужные антитела) могут включать создание рекомбинантных МКА (на основе генов, кодирующих секретированные В-клеткой МКА) или получение лимфобластоидных линий с помощью трансформации EBV с последующей стабилизацией путём слияния с клетками миеломы (о чём подробнее будет сказано ниже). Это только один из возможных описанных форматов таких методов, могут быть и другие варианты, в зависимости от поставленных задач. Например, если стоит задача вести отбор В-клеток по связыванию антигена с мембранным рецептором на поверхности В-клеток памяти, то предлагаются несколько иной дизайн и состав реактивов внутри микрокапель [29]. Используя подобные методы, исследователям удаётся в одном раунде добиться, например, 800-кратного увеличения доли лимфоцитов, секретирующих антитела к антигену [29]. Микрокапли с заключёнными в них В-лимфоцитами (например, взятые у людей, перенёвших вирусное заболевание), можно использовать для определения последовательностей генов, кодирующих V_L и V_H участки антител, образованных индивидуальными В-лимфоцитами, с целью создания соответствующих рекомбинантных МКА. Технологии высокопроизводительного секвенирования нового

поколения (next-generation sequencing, NGS) в сочетании с методами биоинформатики позволяют также определить наиболее часто встречающиеся последовательности переменных участков. Предполагается, что они принадлежат антителам, специфичным к возбудителю данного заболевания. Далее на основании этой информации можно создать рекомбинантное МКА с последующим изучением его биологических свойств, например, способности нейтрализовать вирус и др. [9, 18, 19].

У микрожидкостных методов есть немало преимуществ. Это и огромная пропускная способность, позволяющая за несколько часов анализировать миллионы клеток, и экономия сред и реагентов. Важно, что подобные технологии позволяют достигать высоких концентраций МКА, полученных даже от одной В-клетки. При использовании этих методов можно вести поиск МКА без привязки к заранее выделенному известному антигену. Например, можно выяснить как МКА, секретлируемые в культуральную среду, влияют на способность инфекционных вирусных частиц заражать клетки-мишени, т. е. обладают ли эти МКА нейтрализующими свойствами [9, 18, 19].

Преимущества классической гибридомной технологии

Возвращаясь к гибридомам, следует отметить, что, несмотря на перспективность новых «негибридных» методов, ни один из них не нашёл ещё такого широкого применения, как «старая» ГТ. В частности, на это обстоятельство нередко обращают внимание в ряде зарубежных обзоров, посвящённых описанию прогресса в области получения МКА [3, 6, 30]. Действительно, этот «старый» подход, изобретённый уже более полувека назад (первая работа по получению гибридом опубликована в 1975 г.), продолжает очень широко использоваться.

Сохранение популярности старой ГТ, по-видимому, можно объяснить двумя основными причинами. Первая причина связана со свойствами самого продукта — МКА, образованных гибридомами. А именно, ГТ позволяет получать МКА природного происхождения, возникающие в результате дифференцировки В-лимфоцитов в зародышевых центрах лимфоидных органов, например, селезёнки мыши (если речь идёт о мышинных гибридомах), где переменные участки антител подвергаются супермутагенезу с отбором антител с наиболее аффинными сочетаниями V_H и V_L пар, также происходит класс-переключение антител с IgM на другие изотипы. Таким образом, гибридомная технология позволяет получать «обессмерченные» (иммортиализованные) линии клеток, способные секретировать в культуральную среду МКА со структурой природных антител. Такие антитела отличаются стабильностью, их удобнее использовать в исследовательских це-

лях и для конструирования различных иммунохимических тест-систем, чем, например, образуемые с помощью метода фаг-дисплея фрагменты антител (которые могут потребовать дальнейшей доработки с помощью генной инженерии) [3, 6, 30]. Все эти свойства присущи и МКА, продуцируемым упомянутым выше гибридомам человека. Таким образом, делается ненужным процесс гуманизации антител (если стоит задача получения терапевтического МКА), а получение, при необходимости, рекомбинантных МКА (на основе природных) сильно упрощается. Важно также, что в организме происходит негативный отбор В-клеток, продуцирующих антитела к собственным антигенам белковой и другой биохимической природы, что уменьшает вероятность нежелательных аутоиммунных реакций при использовании МКА с «природными» сочетаниями переменных участков (V_L и V_H) в терапии. Напротив, Fab-фрагменты и другие формы антител, образованные в результате случайного спаривания V_H и V_L в технологии фагового дисплея, как считается, с большей вероятностью могут проявлять кросс-реактивность по отношению к аутоантигенам и обладать большей иммуногенностью [3, 6, 13].

Вторая причина сохраняющейся популярности ГТ — очевидно, чисто практического и финансового свойства. Метод получения гибридом не требует сложного и дорогого лабораторного оборудования, и в силу своей «биологичности» он может легко осваиваться не только сотрудниками биотехнологических фирм, но и специалистами научных лабораторий, относящихся к самым разным направлениям в области биологических наук. Для получения внутрилабораторных МКА для конкретных исследовательских целей научной группы (например, физиологического профиля) не требуются специализация в области технологий рекомбинантных ДНК, соответствующее специальное оборудование и дорогостоящие реагенты.

«Негибридомные» методы получения МКА, напротив, требуют специализации в области генной инженерии, дорогостоящего оснащения лаборатории и обеспечения реагентами, поэтому они доступны немногим лабораториям и крупным биотехнологическим компаниям. Кроме того, эти методы нередко запатентованы и трудно воспроизводимы, в том числе из-за отнесения части информации к области «коммерческой тайны» биотехнологических компаний, производящих с помощью этих методов МКА или специальное оборудование (например, микрожидкостные системы) для получения МКА. Однако с учётом перспективности этих новых направлений авторы многих обзоров поднимают вопрос о необходимости сделать указанные технологические достижения более доступными для широкого научного сообщества в разных областях биологии, в том числе путём проведения специ-

альных практических семинаров, тренингов и т.п., способствующих более широкому освоению этих технологий [13, 18].

Современная модификация метода G. Köhler и C. Milstein

В то же время и старая ГТ восприняла ряд современных усовершенствований, что, по мнению ряда авторов, может придать ей второе дыхание, открыть новые возможности [3, 6]. Ниже приведены некоторые примеры ряда важных усовершенствований, предлагаемых в области ГТ.

Во-первых, для выделения специфических гибридом после слияния всё большее применение находят стерильные флуоресцентные клеточные сортеры. Показано, что на поверхности секретирующих МКА клеток мышинных гибридом представлены BCR с переменными участками той же специфичности, что и секретируемые этими клетками МКА [31]. Поэтому вместо того, чтобы проводить трудоёмкое тестирование на специфичность отдельных колоний гибридом после слияния (с последующим многократным клонированием отобранных гибридом), можно прибегнуть к селекции и клонированию гибридом, используя стерильные клеточные сортеры [31]. Смесь слившихся клеток после отбора гибридных клеток на среде ГАТ (для удаления неслившихся клеток) можно связать с антигеном, несущим флуоресцентную метку, и подвергнуть отбору на клеточном сортере. Устройство отберёт меченые клетки (которые связали антиген через свои поверхностные BCR) и разместит их по отдельным лункам культуральных микропланшетов. Таким образом сразу возможно произвести и отбор гибридом, секретирующих МКА к антигену, и их первоначальное клонирование. Это не только намного сокращает время получения гибридомной клеточной линии, экономит среды, культуральную посуду и т.п., но и резко увеличивает пропускную способность технологии. Можно охватить тестированием большие популяции лимфоцитов от нескольких иммунных мышей, что увеличивает шанс найти наиболее подходящие МКА. Этот метод используется и для отбора и клонирования гибридом человека, однако ограничением является то обстоятельство, что линии, полученные из В-лимфоцитов человека, трансформированных EBV, нередко могут слабо экспрессировать мембранные BCR [26]. Также для отбора МКА-секретирующих гибридом и их быстрого клонирования можно использовать микрожидкостные системы типа описанных выше на примере отбора индивидуальных В-лимфоцитов, продуцирующих антитела [27].

Другим усовершенствованием, часто упоминаемым в обзорах, посвящённых развитию ГТ, является использование полужидких сред для отбора и

клонирования гибридом [6, 26]. В такие среды можно добавить, например, наночастицы с антигеном и вторые антитела, несущие флуоресцентную метку. В полужидких средах гибридомные клетки растут в виде отдельных колоний (клонов), а секретируемые ими МКА концентрируются вокруг этих колоний. За счёт образования иммунных комплексов вокруг клонов гибридом, секретирующих нужные МКА, при флуоресцентной микроскопии будет обнаруживаться свечение. Эти клоны можно извлечь из полужидкой среды для дальнейших манипуляций. Метод позволяет одновременно выявлять и клонировать секретирующие МКА гибридомы и препятствует вытеснению клонов, активно продуцирующих МКА, нескретирующими, но быстро растущими клетками. Ряд фирм выпускает специальное оборудование, делающее более удобным для исследователей использование этого метода.

Кроличьи гибридомы

Важным направлением является создание гибридом на основе клеток других видов животных (не мышинных). Вскоре после появления ГТ у исследователей возникло ожидаемое стремление приложить этот метод к такому животному, как кролик. Поликлональные кроличьи антитела отличаются высокой аффинностью, и иммунная система кролика способна давать более сильный гуморальный иммунный ответ по сравнению с мышью. Однако получение кроличьих МКА с помощью ГТ оказалось нелёгким делом, т. к. не было в наличии подходящего партнёра для слияния с В-лимфоцитами. Оказалось, что у кроликов не возникает миелом, из которых можно было бы создать клеточную линию (подобно созданию линий мышинных миеломных клеток, используемых для получения мышинных МКА). Межвидовые же гибридомы от слияния В-лимфоцитов кролика и миеломы мыши были очень нестабильны, быстро теряли хромосомы, утрачивая способность образовывать МКА. Все же, благодаря специальным усилиям, некоторым исследователям с использованием генетически модифицированных кроликов удалось в 1995 г. получить клеточную линию 240E-W (наподобие мышинной миеломы), относительно пригодную для получения кроличьих гибридом [32]. В дальнейшем, на протяжении 1997–2001 гг., были предприняты усилия по улучшению качества этой линии как партнёра для гибридизации (в частности, пришлось избавляться от секреции этими клетками собственных иммуноглобулинов и решать ряд проблем с культивированием и стабильностью гибридом), и в 2013 г. на улучшенный вариант этой линии (240E-W2) был выдан международный патент [32]. Таким образом, в отличие от клеток миеломы мыши, щедро предоставленных С. Milstein для пользования международному научному сообществу, кроличья

линия — аналог мышинных миелом — охраняется патентованием.

В настоящее время ряд биотехнологических компаний специализируются на производстве и продаже кроличьих МКА. FDA одобрило несколько кроличьих МКА для применения в диагностических целях. Кроме того, ряд терапевтических МКА, исходно являющихся продуктами кроличьих гибридом, проходят в настоящее время клинические испытания [32]. Тем не менее отмечается, что получение кроличьих гибридом остаётся технически более сложной задачей, чем в случае мышинных гибридом. Кроличьи гибридомы, по-видимому, всё же менее стабильны, более сложны в культивировании, и к тому же есть проблемы с патентной охраной линии миеломных кроличьих клеток, используемых в качестве партнёра для слияния [32].

Куриные и межвидовые гибридомы

В литературе описаны отдельные куриные гибридомы, продуцирующие куриные МКА класса IgY; эти линии были получены от слияния В-лимфоцитов иммунных кур с клетками куриной миеломы [6]. Интерес к куриным IgY-антителам связан с тем, что, как считается, они могут иметь ряд преимуществ перед антителами млекопитающих вследствие эволюционной отдалённости птиц [33]. Так, предполагается, что в некоторых случаях у кур можно рассчитывать получить иммунный ответ на ряд антигенов, на которые иммунная система млекопитающих не реагирует. Однако широко ГТ для получения МКА кур не используется, скорее для получения рекомбинантных МКА кур применяется технология фагового дисплея [6].

То же относится и к сообщениям о получении гибридом некоторых других видов животных, например коров [6]. Из млекопитающих, наряду с мышью, изначально достаточно широкое распространение получила практика получения МКА крыс с использованием клеток миеломы крысы или миеломы мыши для слияния с В-клетками крысы (в отличие от нестабильных гибридов соматических клеток мыши и кролика, быстро теряющих хромосомы и секрецию МКА, межвидовые гибриды мышь × крыса более стабильны) [34].

Человеческие гибридомы

Особого рассмотрения заслуживает такое направление, как получение человеческих гибридом, секретирующих человеческие МКА. Это направление давно привлекло внимание исследователей и как путь изучения, например, аутоиммунных нарушений в патогенезе различных заболеваний, и как возможный источник терапевтических МКА, имеющих структуру и свойства неизменённых (природных) МКА [6, 19, 26]. Для получения таких гибридом можно использовать В-клетки из крови чело-

века. Однако эта задача во многом остаётся весьма технически непростой, несмотря на достигнутые в этом направлении успехи. Это связано с несколькими причинами. Во-первых, отсутствует клеточная линия, способная при слиянии поддерживать секрецию МКА в гибридах столь же эффективно и стабильно, как это происходит в мышинных гибридомах (а межвидовые гибриды В-лимфоцитов человека с клетками миеломы мыши отличаются сильной нестабильностью генома, быстро теряя хромосомы человека и, соответственно, способность секреции МКА). Во-вторых, в крови человека содержание В-лимфоцитов, секретирующих антитела искомой специфичности, очень мало по сравнению, например, с селезёнкой иммунной мыши. В попытках преодоления технических сложностей обратились к трансформации В-клеток крови с помощью EBV для получения трансформированных лимфоидных клеточных линий, продуцирующих МКА. Однако при этом трансформацию претерпевала небольшая доля клеток, и такие линии быстро утрачивали секрецию МКА. В дальнейшем эффективность вирусной трансформации удалось повысить, используя дополнительные активаторы В-лимфоцитов (например, CpG-содержащие олигонуклеотиды и интерлейкины) [6, 19, 26].

Для стабилизации трансформированных вирусом линий эти клетки дополнительно сливают с клетками гибридных линий, полученных, например, от слияния клеток миелом человека и клеток мышинной миеломы. По-видимому, такие гибридные линии лучше обеспечивают стабильную секрецию МКА в конечных гибридах, чем использование в качестве партнёра для слияния с EBV-трансформированными В-клетками просто клеток линий миелом человека, которые удалось получить в настоящее время [26]. Однако всё же ГТ в приложении к клеткам человека значительно уступает по своей эффективности технологии мышинной гибридомы, являясь значительно более сложной задачей [6, 26].

Новые методы гибридизации клеток

Дальнейшее повышение эффективности технологии получения гибридом связывают, в частности, с новыми методами гибридизации клеток, основанными на использовании электрических импульсов. Электрические методы для слияния клеток уже широко применяются для получения гибридом, позволяя значительно увеличить частоту слияния — по разным данным, от 2 до нескольких десятков раз [3, 6, 26, 35, 36]. Ряд лабораторий описали применение приборов для электрослияния собственного изготовления, однако такое оборудование уже выпускается рядом биотехнологических компаний. Например, по сообщению Т. Kobayashi и соавт., частота выхода мышинных и крысиных гибридом, секретирующих МКА к антигену, при электрослиянии

(с помощью прибора японской фирмы) оказалась в 5 раз выше, чем при использовании ПЭГ [36]. Интересно, что когда вместо клеток селезёнки иммунных животных (мышей и крыс) при электрослиянии использовали лимфоузлы, то по сравнению с обычным протоколом (слияние клеток селезёнки с клетками миеломы с помощью ПЭГ) количество гибридом — продуцентов нужных МКА — возросло в 50 раз [36]. Авторы считают, что такие модификации могут значительно повышать эффективность метода, в том числе уменьшая число использованных животных. Эти данные подтверждают более ранние сообщения о полезности использования в ГТ не только клеток селезёнки иммунных животных (наиболее частая практика), но и клеток лимфоузлов и, по некоторым данным, костного мозга, богатого плазматическими клетками, секретирующими антитела. Причём, по некоторым данным, В-лимфоциты из разных органов иммунной системы могут различаться по спектру антител, которые они продуцируют [37].

Особенно большие надежды связывают с новейшими методами соматической гибридизации клеток на основе, например, лазерных и микрожидкостных технологий. Наибольшую эффективность слияния обещает привлечение микрожидкостных технологий [3, 38]. Если частота слияния при использовании ПЭГ составляет в лучшем случае примерно 1 на 10^4 клеток, то в отношении этих новых методов сообщается о возможности достижения частоты слияния около 80–95% клеток при сохранении жизнеспособности более половины гибридных клеток [3, 38]. Высокая частота слияния (с сохранением жизнеспособности гибридов) очень важна при получении человеческих гибридом, когда число В-лимфоцитов, способных секретировать МКА нужной специфичности, в крови донора может быть очень низким (и при низкой частоте слияния такие клетки просто будут потеряны).

Трансгенные животные

Другим способом получения МКА человека с помощью ГТ является использование трансгенных животных, чаще всего лабораторных мышей [6]. Например, получены трансгенные мыши, у которых гены иммуноглобулинов мыши заменены на гены, отвечающие за образование антител у человека. Эти животные способны давать гуморальный ответ на иммунизацию антигеном с образованием антител, которые прошли через созревание аффинности в результате супермутагенеза и отбора В-клеток в зародышевых лимфоидных центрах, и их В-лимфоциты можно сливать с миеломой мыши обычным способом с получением мышинных гибридом, продуцирующих человеческие МКА [7]. Однако способность обеспечивать разнообразие антител у трансгенных мышей ниже, чем в организме чело-

века (отчасти это можно компенсировать путём получения гибридом от нескольких иммунных животных) [6]. Также в организме мыши хуже может быть «контроль качества антител», чем в организме человека, в отношении, например, аутоиммунных реакций [6]. Поэтому использование трансгенных мышей вряд ли может полностью заменить получение МКА человека с помощью гибридомы человека, хотя само создание таких животных может облегчиться с использованием новых эндонуклеазных методов редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9 [39]. Получены также трансгенные животные других видов (например, куры и кролики), способные образовывать антитела человека [6]. Однако использование В-лимфоцитов этих животных для получения гибридом ограничивается техническими сложностями, главным образом из-за особенностей линий клеток, которые возможно использовать в качестве партнёров для соматической гибридизации [6].

Модификация иммунизации животных

Важные изменения касаются также начального этапа в получении МКА путём ГТ — иммунизации. Самый распространённый способ иммунизации мышей при получении мышинных МКА, например, к белковым антигенам — это введение очищенного антигена (нативного или рекомбинантного белка) с адьювантом. Однако под воздействием адьюванта может изменяться конформация молекулы белка-антигена. Предполагают, что именно с этим связан тот факт, что большинство гибридом, получаемых после иммунизации мышей описанным способом, секретируют МКА, распознающие линейные эпитопы, т. е. определённые аминокислотные последовательности в структуре белков-антигенов [6, 40]. Вместе с тем при получении, например, терапевтических МКА часто необходимо добиться, чтобы отобранные МКА распознавали конформационные эпитопы, т. е. какие-то участки на вторичной, третичной и четвертичной структуре антигена. Например, такая задача может стоять при получении нейтрализующих МКА к вирусным антигенам с целью препятствовать взаимодействию вируса с клеточным рецептором, с помощью которого он проникает в клетку (как это происходит, например, в случае коронавируса SARS-CoV-2 и многих других).

Одним из подходов, применяемых для решения этой задачи, является иммунизация животных (например, мышей) с помощью ДНК-векторов (например, в виде плазмид), кодирующих данный белковый антиген [6, 40]. Другой путь — использование вирусоподобных частиц, во многом сохраняющих структуру вирусов, но лишённых инфекционности, т. к. они не содержат вирусного генома [41, 42]. Для получения МКА к конформационным эпитопам используют также иммунизацию клеточными «дисплеями», на поверхности которых экспрессируются

антигены, сохраняющие нативную структуру. Такой путь способствует получению МКА, например, к различным рецепторным белкам. В качестве дисплеев используют клетки млекопитающих и рекомбинантных дрожжей, экспрессирующих на своей поверхности антигены [6]. Следует отметить, что здесь задачи ГТ во многом совпадают с задачами, стоящими при разработке вакцин, где также используют подходы в поисках путей получения адекватного иммунного ответа [41].

В этой связи хотелось бы особо остановиться на таком новом направлении, как использование для иммунизации целых рекомбинантных дрожжей, экспрессирующих антиген [43–47]. Оказывается, дрожжевые клетки (относящиеся к видам, используемым в кулинарии и пищевой промышленности) обладают мощными адьювантными свойствами, успешно индуцируя сигналы врождённого иммунитета (например, через толл-подобные рецепторы), при этом стимулируется и адаптивный иммунный ответ, как клеточный, так и гуморальный [44]. Причём интересно, что, как показано в некоторых работах, для иммунизации можно использовать не только антигены, представленные на поверхности дрожжей (формат дисплея), но и антигены, находящиеся внутри целых рекомбинантных клеток [44, 47]. Например, была показана индукция гуморального ответа при пероральной иммунизации мышей целыми клетками рекомбинантных дрожжей, экспрессирующими (внутри клеток) вирусный антиген — капсидный белок вируса некроза нервной ткани красного морского окуня (Red grouper nervous necrosis virus, RGNNV). RGNNV — это один из представителей более обширной группы вирусов некроза нервной ткани, вызывающих заболевание у многих видов рыб [48]. Затем эффективность этого метода иммунизации была продемонстрирована непосредственно на рыбах [49]. Показана также возможность индукции значительного гуморального и клеточного ответа к антигенам вируса геморрагической лихорадки денге при внутрибрюшинной [50] и пероральной иммунизации мышей целыми рекомбинантными дрожжами, экспрессирующими вирусные белки [51].

Указанные подходы с использованием целых рекомбинантных дрожжевых клеток обсуждаются в литературе как возможное новое перспективное направление для вакцинологии [43–47]. Причём способность вызывать иммунный ответ проявляют не только свежие, но и высушенные рекомбинантные дрожжи — продуценты антигена. Рекомбинантные дрожжи в высушенном виде сохраняют антиген даже при высоких температурах, что важно для проведения вакцинации в жарких странах. Также их можно использовать для оральной иммунизации. Производство и использование таких вакцин (с учётом затрат на хранение при транспортировке), полученных на основе синтезирующих антиген це-

лых дрожжевых клеток, может оказаться более дешевым, что имеет немалое практическое значение [43–47]. Этот пример интересен тем, что здесь развитие нового метода идёт не по пути усложнения технологии, а, скорее, направлено в сторону некоторого упрощения (например, не требуется очистка антигена). Можно предположить, что этот подход представляет интерес не только для вакцинологии, но и для ГТ (последнее утверждение требует, однако, экспериментальной проверки).

Для получения МКА к конформационным эпитопам важен не только этап иммунизации, но и этап селекции гибридом, секретирующих наиболее специфичные и аффинные МКА. При часто используемом твёрдофазном иммуноферментном анализе для выявления продуцентов специфических антител антиген прикрепляют к поверхности пластиковых планшетов, при этом конформационное состояние белковой молекулы может изменяться и многие конформационные эпитопы могут утрачиваться [31]. Одним из подходов к преодолению этой проблемы является использование флуоресцентных клеточных сортеров. Этот метод позволяет не только ускорить отбор и клонирование гибридом (как описано выше), но и отбирать гибридомы, продуцирующие МКА к конформационным эпитопам [31]. Действительно, в этом случае отбираются гибридомные клетки, на поверхности которых экспрессируются BCR (с вариabельными частями, идентичными МКА, секретируемым этими клетками), взаимодействующие с антигеном в растворе (что способствует сохранению естественной конформации белковой молекулы) [31].

Сочетание различных методов получения МКА на примере антител к HCV

В настоящее время не существует какого-то метода получения МКА, который мог бы считаться однозначно методом наилучшего выбора, неким «золотым стандартом» [6]. Разные методы могут дополнять друг друга при получении МКА, используемых в исследованиях одного и того же объекта. Это можно проиллюстрировать на примере вируса гепатита С (HCV).

Вскоре после открытия HCV для изучения белков этого вируса стали использовать и МКА, получаемые с помощью ГТ [52]. В частности, в этот период были получены МКА к белку нуклеокапсида HCV, получившего название ядерного антигена HCV (HCV core antigen, HCVcAg) [53]. На основе некоторых из этих МКА позднее была создана и внедрена в практику диагностики HCV иммуноферментная тест-система (устроенная по типу сэндвич-метода) для выявления в крови HCVcAg. Такой тест, в настоящее время выпускаемый 5 фармацевтическими компаниями (наиболее признанным тестом является одобренная в Евросоюзе хемилюминесцентная диагностическая система «Abbott

ARCHITECT HCV»), может использоваться как для подтверждения наличия инфекции после выявления антител к вирусу, так и для обнаружения вируса в крови на раннем этапе инфекции, когда антитела к нему ещё не выработались (другими словами, данный тест может способствовать более раннему обнаружению заражённости HCV) [54]. Преимущество заключается в том, что данная тест-система проста в исполнении, не требует специального оборудования помещения и дорогостоящих приборов, что может быть особенно полезно в развивающихся странах с ограниченным бюджетом здравоохранения.

Однако в руководстве ВОЗ, посвящённом диагностике и лечению гепатита С, отмечается, что всё же изученность результатов применения данного теста меньше, чем диагностики, основанной на выявлении вирусной РНК с помощью ПЦР; кроме того иммуноферментный тест отличается относительно высокой стоимостью, что снижает его доступность для национальных систем здравоохранения небогатых стран⁷. Также, хотя чувствительность, например, системы Abbott ARCHITECT HCV относительно высока, все же она уступает чувствительности метода ПЦР, и риск пропустить инфекцию, получив ложноотрицательный результат выше [55]. В связи с этим продолжают поиск и исследования новых МКА к HCVcAg с целью создания новых тест-систем для выявления этого вирусного белка. Например, в 2023 г. была опубликована работа испанских авторов, в которой описано получение с помощью ГТ панели мышинных МКА к HCVcAg и показана их потенциальная перспективность для создания новой иммуноферментной системы для определения этого антигена [56]. В этой связи следует отметить, что у HCVcAg обнаружены сильные иммуносупрессивные свойства [57]. Возможно, с этим связан тот факт, что только очень ограниченное число биотехнологических компаний осуществляют производство систем для определения HCVcAg, т. к. получение высокоаффинных МКА к данному антигену, по-видимому, оказывается на практике более сложной задачей, чем получение МКА к другим известным вирусным антигенам, например, поверхностному антигену вируса гепатита В (HBVsAg) [42].

Большую роль различные технологии получения МКА играют в исследованиях по поиску, получению и изучению эпитопов антител широкого нейтрализующего действия. Предполагается, что такие МКА могли бы способствовать терапии HCV [52, 58, 59]. С другой стороны, изучение, с опорой на биоинформатику, эпитопов нейтрализующих антител широкого спектра рассматривается как один

⁷ Unitaaid. Hepatitis C diagnostics technology landscape; 2019. URL: https://unitaid.org/assets/HepC-Dx-Tech-Landscape_May2019.pdf (дата обращения: 11.06.2024).

из подходов к созданию эффективной вакцины, являясь перспективным направлением так называемой «обратной вакцинологии» [59–61]. Поиск нейтрализующих МКА получил особенно сильный стимул к развитию в связи с разработкой 2 клеточных систем, позволяющих изучать взаимодействие антител с HCV на модели вирусных псевдочастиц (HCVpp), экспрессирующих поверхностные белки HCV, и рекомбинантных вирусов, способных размножаться в культивируемых клетках (HCVcc) [62, 63]. В 2001 г. с помощью ГТ были получены мышинные МКА А33 к вирусному поверхностному белку E2, которые, как оказалось, проявляют очень сильные широко нейтрализующие свойства при испытаниях на моделях HCVpp и HCVpp [64]. Позднее были также получены широко нейтрализующие МКА человека, направленные к антигену E2, при этом эпитопы некоторых из человеческих МКА частично перекрываются с эпитопом мышинных МКА [59]. Среди описанных разными авторами человеческих антител с широкой нейтрализующей активностью по отношению к HCV есть МКА, выделенные разными методами, например, на основе изолированных В-клеток с помощью ГТ [63], с применением фагового дисплея [65, 66] и путём анализа генов переменных участков антител из крови инфицированных людей методами NGS с последующим конструированием рекомбинантного МКА [67]. Однако пока не удалось получить МКА с доказанной терапевтической активностью в клинических испытаниях, исследования в этом направлении продолжаются.

Технология *in silico*

Наконец, рассмотрение методов получения МКА было неполным без хотя бы краткого упоминания такого подхода, как технология *in silico* (в компьютере). Данные о трёхмерной структуре антител, их комплексов с антигеном могут быть получены как с использованием экспериментальных методов (рентгеноструктурный анализ или ядерный магнитный резонанс), так и с помощью моделирования *in silico*. Этот метод позволяет предсказывать трёхмерную структуру антител, идентифицировать аминокислоты, которые вносят наибольший вклад во взаимодействие молекул антитела и антигена, и анализировать последствия их замены, например, в результате мутагенеза (метод рационального дизайна), для создания антител с увеличенным аффинитетом [8].

Заключение

Несмотря на развитие методов компьютерного моделирования, как показывает практика, результаты, полученные с помощью экспериментальных подходов, до сих пор более надёжны. В некоторых случаях получение антител со свойствами, превышающими их природный аналог, трудно осуществ-

вимо и связано с тем, что в ходе естественного созревания антител в организме и их отбора уже была выбрана их оптимальная структура [8].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Абелев Г.И. Моноклональные антитела. *Соросовский образовательный журнал*. 1998;1:16–20. Abelev G.I. Monoclonal antibodies. *Soros Educ. J.* 1998;1:16–20.
2. Рингерц Н., Сэвидж Р. *Гибридные клетки*. Пер. с англ. М.;1979. Ringertz N.R., Savage R.E. *Cell Hybrids*. New York;1976.
3. Steele T. Life begins at forty — hybridomas: ageing technology holds promise for future drug discoveries. *GaBI J.* 2016;5(1): 21–6. DOI: <https://doi.org/10.5639/gabij.2016.0501.006>
4. Массино Ю.С., Цибезов В.В., Дмитриев А.Д., Коляскина Г.И. Получение и характеристика моноклональных антител к α -эндорфину человека. *Биотехнология*. 1987;3(6):730–4. Massino Yu.S., Tsibezov V.B., Dmitriev A.D., Kolyaskina G.I. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to human α -endorphin. *Biotechnology*. 1987;3(6):730–4.
5. Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Дмитриев Д.А. и др. Твердофазный иммуноферментный анализ: история, теория и практическое использование. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(3):117–25. Tarakanova Yu.N., Dmitriev A.D., Dmitriev D.A., et al. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): history, theory and application. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;96(3):117–25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-117-125> EDN: <https://elibrary.ru/bwqijk>
6. Parry H.A., Shukla S., Samal S., et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int. Immunopharmacol.* 2020;85:106639. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>
7. Buss N.A., Henderson S.J., McFarlane M., et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012;12(5):615–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>
8. Альтшулер Е.П., Серебряная Д.В., Катруха А.Г. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. *Успехи биологической химии*. 2010;50:203–58. Altshuler E.P., Serebryanaya D.V., Katrukha A.G. Obtaining recombinant antibodies and ways to increase their affinity. *Biochemistry (Moscow)*. 2010;50:203–58.
9. Меркульева Ю.А., Щербakov Д.Н., Ильичев А.А. Методы получения моноклональных антител для терапии и профилактики вирусных инфекций. *Биоорганическая химия*. 2022;48(3):279–95. Merkul'eva Yu.A., Shcherbakov D.N., Il'ichev A.A. Methods for obtaining monoclonal antibodies for the prevention and treatment of viral infection. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2022;48(3):279–95. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0132342322020166> EDN: <https://elibrary.ru/wdrbhb>
10. Loyau J., Rousseau F. Cloning, reformatting, and small-scale expression of monoclonal antibody isolated from mouse, rat, or hamster hybridoma. *Methods Mol. Biol.* 2014;1131:207–28. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_13
11. Lyu X., Zhao Q., Hui J., et al. The global landscape of approved antibody therapies. *Antib. Ther.* 2022;5(4):233–57. DOI: <https://doi.org/10.1093/abt/tbac021>
12. Koenig P., Fuh G. Selection and screening using antibody phage display libraries. *Methods Mol. Biol.* 2014;1131:133–49. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_9
13. Laustsen A.H., Greiff V., Karatt-Vellatt A., et al. Animal immunization, *in vitro* display technologies, and machine learning for

- antibody discovery. *Trends Biotechnol.* 2021;39(12):1263–73.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.03.003>
14. Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H.R. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:433–55.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.002245>
15. Zhang Y. Evolution of phage display libraries for therapeutic antibody discovery. *MAbs.* 2023;15(1):2213793.
DOI: <https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2213793>
16. Valldorf B., Hinz S.C., Russo G., et al. Antibody display technologies: selecting the cream of the crop. *Biol. Chem.* 2021;403(5-6):455–77.
DOI: <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0377>
17. Chikae A.N., Rudometov A.P., Merkul'yeva Yu.A., Karpenko L.I. Phage display as a tool for identifying HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2021;25(5):562–72.
DOI: <https://doi.org/10.18699/VJ21.063>
18. Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol.* 2021;42(12):1143–58.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.10.008>
19. Лушова А.А., Бязрова М.Г., Прилипов А.Г. и др. Новое поколение методов получения человеческих моноклональных антител. *Молекулярная биология.* 2017;51(6):899–906. Lushova A.A., Byazrova M.G., Prilipov A.G., et al. Next-generation techniques for discovering human monoclonal antibodies. *Molecular Biology.* 2017;51(6):782–7.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893317060103>
EDN: <https://elibrary.ru/xxcred>
20. Оксанич А.С., Никонова А.А., Зверев В.В. Рекомбинантные антитела в противовирусной терапии: достижения и перспективы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018;95(6):114–23. Oksanich A.S., Nikonova A.A., Zverev V.V. Recombinant antibodies in anti-viral therapy: achievements and perspectives. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2018;95(6):114–23.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-114-123>
EDN: <https://elibrary.ru/ccgvsi>
21. Otsubo R., Yasui T. Monoclonal antibody therapeutics for infectious diseases: Beyond normal human immunoglobulin. *Pharmacol. Ther.* 2022;240:108233.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108233>
22. Бязрова М.Г., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б. и др. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. *Иммунология.* 2020;41(6):501–10. Byazrova M.G., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., et al. IL-21/CD40L stimulation of human B-lymphocytes *in vitro* and their characteristics. *Immunologiya.* 2020;41(6):501–10.
DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-6-501-510>
EDN: <https://elibrary.ru/vesnlu>
23. Whaley R.E., Ameny S., Arkatkar T., et al. Generation of a cost-effective cell line for support of high-throughput isolation of primary human B cells and monoclonal neutralizing antibodies. *J. Immunol. Methods.* 2021;488:112901.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112901>
24. Braham M., van Binnendijk R., Buisman A.M., et al. A synthetic human 3D *in vitro* lymphoid model enhancing B-cell survival and functional differentiation. *iScience.* 2022;26(1):105741.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105741>
25. Kwakkenbos M.J., Diehl S.A., Yasuda E., et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat. Med.* 2010;16(1):123–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2071>
26. Smith S.A., Crowe J.E.Jr. Use of human hybridoma technology to isolate human monoclonal antibodies. *Microbiol. Spectr.* 2015;3(1):AID-0027-2014.
DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0027-2014>
27. Debs B.E., Utharala R., Balyasnikova I.V., et al. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012;109(29):11570–5.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1204514109>
28. Seah Y.F.S., Hu H., Merten C.A. Microfluidic single-cell technology in immunology and antibody screening. *Mol. Aspects Med.* 2018;59:47–61.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.09.004>
29. Rutkauskaitė J., Berger S., Stavrakis S., et al. High-throughput single-cell antibody secretion quantification and enrichment using droplet microfluidics-based FRET assay. *iScience.* 2022;25(7):104515.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104515>
30. Moraes J.Z., Hamaguchi B., Braggion C., et al. Hybridoma technology: is it still useful? *Curr. Res. Immunol.* 2021;2:32–40.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2021.03.002>
31. Sakaguchi A., Tanaka Y., Shoji E., et al. Rapid, simple, and effective strategy to produce monoclonal antibodies targeting protein structures using hybridoma technology. *J. Biol. Eng.* 2023;17(1):24.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13036-023-00345-9>
32. Chen Z., Wang G. Progress and perspectives of rabbit monoclonal antibodies. *Blood&Genomics.* 2023;7(1):13–21.
DOI: <https://doi.org/10.46701/BG.2023012022038>
33. Печельюлко А.А., Тараканова Ю.Н., Дмитриев Д.А. и др. Сравнительный анализ эффективности использования антител птиц и млекопитающих в сэндвич-методе определения HBsAg. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017;53(1):104–14. Pechelyul'ko A.A., Tarakanova Yu.N., Dmitriev D.A., et al. A comparative analysis of the efficiency of bird and mammalian antibodies in HBsAg sandwich assay. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017;53(1):114–22.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683817010136>
EDN: <https://elibrary.ru/yvdqyr>
34. Fang J.C., Bodeus M., Burtonboy G. Study on rat-rat hybridoma technique and production of rat monoclonal antibodies against HIV and HBsAg. *Chin. J. Biotechnol.* 1991;7(1):73–81.
35. Силкина М.В., Карцева А.С., Рябко А.К. и др. Оптимизация условий электрослияния для получения гибридом, синтезирующих человеческие моноклональные антитела. *Биотехнология.* 2021;37(2):65–75. Silkina M.V., Kartseva A.S., Ryabko A.K., et al. Optimization of electrofusion parameters for producing hybridomas synthesizing human monoclonal antibodies. *Biotechnology in Russia.* 2021;37(2):65–75.
DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-2-65-75>
EDN: <https://elibrary.ru/avptei>
36. Kobayashi T., Namba M., Kohno M., et al. An improved iliac lymph node method for production of monoclonal antibodies. *Dev. Growth Differ.* 2022;64(1):38–47.
DOI: <https://doi.org/10.1111/dgd.12766>
37. Başalp A., Yücel F. Development of mouse hybridomas by fusion of myeloma cells with lymphocytes derived from spleen, lymph node, and bone marrow. *Hybrid. Hybridomics.* 2003;22(5):329–31. DOI: <https://doi.org/10.1089/153685903322538863>
38. Dura B., Liu Y., Voldman J. Deformability-based microfluidic cell pairing and fusion. *Lab Chip.* 2014;14(15):2783–90.
DOI: <https://doi.org/10.1039/c4lc00303a>
39. Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А. и др. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор). *Биомедицина.* 2019;(4):12–33. Koloskova E.M., Karkishchenko V.N., Ezer'skii V.A., et al. Rabbit biomodels of human diseases developed using new genomic technologies. CRISPR/Cas9. *Biomedicine.* 2019;(4):12–33.
DOI: <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>
EDN: <https://elibrary.ru/yrwzbt>
40. Isozaki Y., Tsumoto K., Tomita M. Class-switching of B lymphocytes by DNA and cell immunization for stereospecific monoclonal antibodies against native GPCR. *Immuno.* 2021;1(4):432–41.
DOI: <https://doi.org/10.3390/immuno1040031>

41. Srivastava V., Nand K.N., Ahmad A., Kumar R. Yeast-based virus-like particles as an emerging platform for vaccine development and delivery. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(2):479. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020479>
42. Pechelyulko A., Dmitriev D., Lavrov V., et al. A simple method to purify recombinant HCV core protein expressed in *Pichia pastoris* for obtaining virus-like particles and producing monoclonal antibodies. *Protein Expr. Purif.* 2021;183:105864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105864>
43. Ardiani A., Higgins J.P., Hodge J.W. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res.* 2010;10(8):1060–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00665.x>
44. Kumar R., Kumar P. Yeast-based vaccines: new perspective in vaccine development and application. *FEMS Yeast Res.* 2019;19(2):foz007. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz007>
45. Ivanova E. Yeasts in nanotechnology-enabled oral vaccine and gene delivery. *Bioengineered*. 2021;12(1):8325–35. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1985816>
46. Silva A.J.D., Rocha C.K.D.S., de Freitas A.C. Standardization and key aspects of the development of whole yeast cell vaccines. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2792. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122792>
47. Austriaco N. Yeast oral vaccines against infectious diseases. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1150412. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1150412>
48. Kim H.J., Lee J.Y., Kang H.A., et al. Oral immunization with whole yeast producing viral capsid antigen provokes a stronger humoral immune response than purified viral capsid antigen. *Letts. Appl. Microbiol.* 2014;58(3):285–91. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12188>
49. Cho S.Y., Kim H.J., Lan N.T., et al. Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Vet. Microbiol.* 2017;204:159–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.022>
50. Pambudi S., Sulfiati A., Widayanti T., et al. Humoral and cellular immunity in mice immunized with whole recombinant yeast expressing complex NS2B/NS3 protein of dengue serotype 3. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;913(1):012083. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012083>
51. Bal J., Luong N.N., Park J., et al. Comparative immunogenicity of preparations of yeast-derived dengue oral vaccine candidate. *Microb. Cell Fact.* 2018;17(1):24. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0876-0>
52. Tabll A., Abbas A.T., El-Kafrawy S., Wahid A. Monoclonal antibodies: Principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. *World J. Hepatol.* 2015;7(22):2369–83. DOI: <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i22.2369>
53. Aoyagi K., Ohue C., Iida K., et al. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(6):1802–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1802-1808.1999>
54. Freiman J.M., Tran T.M., Schumacher S.G., et al. Hepatitis C core antigen testing for diagnosis of hepatitis C virus infection. *Ann. Intern. Med.* 2016;165(5):345–55. DOI: <https://doi.org/10.7326/M16-0065>
55. Treatment Action Group. *2020 Pipeline Report: HCV Diagnostics*. New York; 2020.
56. Vidal-Alcántara E.J., Mas V., Yélamos M.B., et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for the detection of the hepatitis C core antigen. *Front. Mol. Biosci.* 2023;10:1225553. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1225553>
57. Jansons J., Sominskaya I., Petrakova N., et al. The immunogenicity in mice of HCV core delivered as DNA is modulated by its capacity to induce oxidative stress and oxidative stress response. *Cells*. 2019;8(3):208. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8030208>
58. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019;156(2):418–30. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
59. Kinchen V.J., Cox A.L., Bailey J.R. Can broadly neutralizing monoclonal antibodies lead to a hepatitis C virus vaccine? *Trends Microbiol.* 2018;26(10):854–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.002>
60. Moxon R., Reche P.A., Rappuoli R. Editorial: reverse vaccinology. *Front. Immunol.* 2019;10:2776. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02776>
61. Pantaleo G., Correia B., Fenwick C., et al. Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2022;21(9):676–96. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00495-3>
62. Kinchen V.J., Bailey J.R. Defining breadth of hepatitis C virus neutralization. *Front. Immunol.* 2018;9:1703. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01703>
63. Desombere I., Mesalam A.A., Urbanowicz R.A., et al. A novel neutralizing human monoclonal antibody broadly abrogates hepatitis C virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res.* 2017;148:53–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.10.015>
64. Tarr A.W., Owsianka A.M., Jayaraj D., et al. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J. Gen. Virol.* 2007;88(Pt. 11):2991–3001. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.83065-0>
65. Schofield D.J., Bartosch B., Shimizu Y.K., et al. Human monoclonal antibodies that react with the E2 glycoprotein of hepatitis C virus and possess neutralizing activity. *Hepatology*. 2005;42(5):1055–62. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.20906>
66. Yokokawa H., Shinohara M., Teraoka Y., et al. Patient-derived monoclonal antibody neutralizes HCV infection *in vitro* and *in vivo* without generating escape mutants. *PLoS One*. 2022;17(9):e0274283. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274283>
67. Skinner N.E., Ogega C.O., Frumento N., et al. Convergent antibody responses are associated with broad neutralization of hepatitis C virus. *Front. Immunol.* 2023;14:1135841. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1135841>

Информация об авторах

Массино Юлия Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1165-2712>

Тараканова Юлия Николаевна — к.б.н., зав. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, ytarakanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3226-5989>

Сегал Ольга Леонидовна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6621-236X>

Information about the authors:

Yulia S. Massino — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1165-2712>

Yulia N. Tarakanova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, ytarakanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3226-5989>

Olga L. Segal — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6621-236X>

ОБЗОРЫ

Печелюлько Анастасия Александровна — н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6628-1576>

Яковлева Динора Абдуллаевна — к.м.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>

Личутина Мария Владимировна — м.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9579-7865>

Дмитриев Дмитрий Александрович — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7397-6499>

Дмитриев Александр Дмитриевич — д.б.н., в.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1132-3708>

Участие авторов. *Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н.* — концепция и дизайн исследования, сбор и анализ источников, написание и редактирование текста; *Сегал О.Л., Яковлева Д.А., Печелюлько А.А.* — сбор источников, редактирование текста; *Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д.* — редактирование текста. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 10.01.2024;
принята к публикации 08.04.2024;
опубликована 29.06.2024

Anastasia A. Pechelyulko — researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6628-1576>

Dinora A. Yakovleva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8771-4177>

Maria V. Lichutina — junior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9579-7865>

Dmitriy A. Dmitriev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7397-6499>

Alexander D. Dmitriev — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1132-3708>

Author contribution. *Massino Y.S., Tarakanova Yu.N.* — concept and design of the study, collection and analysis of sources, writing and editing the text of the article; *Segal O.L., Yakovleva D.A., Pechelyulko A.A.* — collection of sources, editing the text of the publication; *Lichutina M.V., Dmitriev D.A., Dmitriev A.D.* — editing the text of the publication. 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 10.01.2024;
accepted for publication 08.04.2024;
published 29.06.2024



К 70-летию профессора Мурада Киясовича Мамедова

14 мая 2024 г. исполнилось 70 лет Мураду Киясовичу Мамедову — российско-азербайджанскому вирусологу и эпидемиологу, доктору медицинских наук, профессору, заслуженному деятелю науки и техники и заслуженному врачу Азербайджанской Республики, члену редакционного совета «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии».

В 1976 г. М.К. Мамедов с отличием закончил лечебный факультет медицинского института в Баку и был направлен врачом на Азербайджанскую противочумную станцию. Прошёл специализацию в противочумных институтах в Алма-Ате и Ростове-на-Дону. В 1980 г. направлен в аспирантуру по вирусологии в Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, где под руководством академика М.С. Балаяна подготовил и защитил кандидатскую диссертацию по проблеме лабораторной диагностики вирусного гепатита А.

С 1985 г. Мурад Киясович работает в Национальном центре онкологии руководителем лаборатории, а с 1990 г. и по настоящее время — заместителем генерального директора по научной работе. В 1987 г. приказом Министра здравоохранения СССР был назначен ответственным за проведение работы по профилактике СПИД в Азербайджане. В 1991 г. во Всесоюзном онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина АМН СССР защитил докторскую диссертацию «Злокачественные опухоли и инфекции, вызванные ДНК-содержащими онкогенными вирусами».

За годы работы в Национальном центре онкологии М.К. Мамедов провёл несколько многолетних циклов оригинальных клинико-лабораторных исследований, результаты которых впервые позволили объективно оценить клиническую и прогностическую значимость субклинических инфекций, вызванных вирусами гепатитов В и С у больных со злокачественными опухолями. На основе этих данных были разработаны показания и противопоказания для проведения противовирусной терапии таких инфекций у больных раком. Кроме того, благодаря этим исследованиям были оценены масштабы и особенности распространения в Азербайджане не только разных гепатотропных вирусных инфекций, но и герпетических, ретровирусных, респираторных и энтеровирусных инфекций.



За эти годы М.К. Мамедов был руководителем или консультантом 30 кандидатских и 5 докторских диссертаций. Он автор и соавтор 39 книг и монографий, более 700 статей в научных журналах, издаваемых в разных странах, а также 30 методических рекомендаций по вопросам вирусологии, эпидемиологии и инфекционной патологии.

Мурад Киясович — член авторитетных научных обществ: почётный член Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Российского общества гастроэнтерологов, Российского и Европейского

обществ по внутрибольничным инфекциям, Европейского общества по изучению печени и Европейского общества клинической онкологии. В 2001 г. избран вице-президентом Международной экоэнергетической академии, а в 2004 г. — иностранным членом Российской академии естественных наук. Он член редакционных советов нескольких журналов в странах СНГ.

За свои исследования в разные годы М.К. Мамедов был удостоен нескольких дипломов и наград, в том числе присужденной по линии ЮНЕСКО медали «За развитие науки», золотой медали Международной экоэнергетической академии, медали М.С. Балаяна «За достижения в области исследования гепатита Е», золотой медали И.И. Мечникова и др.

Много лет М.К. Мамедов — главный редактор журналов «Биомедицина» и «Современные достижения азербайджанской медицины», издаваемых на русском языке. За эту деятельность Российской академией образования удостоила его медали В.Л. Пушкина. М.К. Мамедов занят и научно-общественной работой: в 1999–2014 гг. он был заместителем председателя Учёного медицинского совета Минздрава, в 2014–2019 гг. — руководителем Комиссии Минздрава Азербайджана по вирусным гепатитам. С 2004 г. читает лекции по вирусным инфекциям врачам Азербайджанского института усовершенствования врачей им. А. Алиева.

Редакционная коллегия «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии», ученики, соратники и друзья поздравляют юбиляра и желают ему дальнейших успехов в научной и педагогической деятельности, крепкого здоровья, душевной стойкости, оптимизма, многих лет жизни для успешной реализации всех творческих замыслов и новых свершений на благо науки!