

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

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

#### ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора

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

*Начальник редакционно-*

*издательского отдела:*  
Осокина Ольга Владимировна

#### РЕДАКЦИЯ:

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

*Заведующая редакцией:*

Устинкова Ольга Владимировна

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

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

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

Подписано в печать 29.06.2024.  
Формат 60×90<sup>1/8</sup>. Тираж 158 экз.  
Усл.-печ. л. 17,5.

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

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

## Заместители главного редактора

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

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

#### PUBLISHER:

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

#### EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on June 29, 2024.

Print format 60×90<sup>1/8</sup>.

Circulation 158 copies.

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

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

## EDITOR-IN-CHIEF

**Vitaly V. Zverev**, 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. Lukashev**, 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

**Georgy 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

<b>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.</b> Геномное разнообразие и анализ детерминант резистентности <i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар Kentucky, изолированных в России*	303
<b>Лобзин Ю.В., Ермоленко К.Д., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Мартенс Э.А., Полев Д.Е., Ермоленко Е.И.</b> Кампилобактериоз: генотипическая характеристика возбудителя и иммунологический статус пациентов*	315
<b>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.</b> Изменения этиологической структуры тяжёлых острых респираторных вирусных инфекций у детей и взрослых под влиянием пандемии COVID-19*	327
<b>Вязовая А.А., Соловьева Н.С., Герасимова А.А., Журавлев В.Ю., Мокроусов И.В.</b> Молекулярная характеристика фторхинолон-устойчивых штаммов <i>Mycobacterium tuberculosis</i> от впервые выявленных больных туберкулёзом на северо-западе России*	342
<b>Селиванова С.Г., Зверев В.В., Пономарева Н.В., Леонов А.В., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Полянина А.В., Новикова Н.А.</b> Обнаружение и типовая идентификация неполиомиелитных энтеровирусов у детей на фоне острых кишечных инфекций различной этиологии: 2018–2023 гг.*	351
<b>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.</b> Разработка методики молекулярного типирования штаммов <i>Bacillus anthracis</i> с использованием новых VNTR- и INDEL-маркеров*	362
<b>Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л.</b> Влияние <i>Yersinia pestis</i> с различным плазмидным составом на мембрану эритроцитов в крови морских свинок	372
<b>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.</b> Влияние углеводных адъювантов в составе экспериментального хантавирусного вакцинного препарата на динамику нейтрализующих антител в сыворотках крови морских свинок	383
<b>ОБЗОРЫ</b>	
<b>Брусина Е.Б.</b> Микробиом больничной среды*	393
<b>Онищенко Г.Г., Кириллов И.А., Борисевич С.В., Сизикова Т.Е., Кротков В.Т.</b> Анализ аэриобиологических исследований с ортопоксвирусами, проводимых Министерством обороны США*	399
<b>Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н., Сегал О.Л., Печелюлько А.А., Яковлева Д.А., Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д.</b> Технология получения моноклональных антител. 50 лет развития	412
<b>ЮБИЛЕИ</b>	
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

<b>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.</b> Genomic diversity and analysis of resistance determinants of <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar Kentucky isolated in Russia* .....	303
<b>Lobzin Yu.V., Ermolenko K.D., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Martens E.A., Polev D.E., Ermolenko E.I.</b> Campylobacteriosis: genotypic characteristics of the pathogen and immunological status of patients* .....	315
<b>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.</b> Changes in the etiological structure of severe acute respiratory viral infections in children and adults under the influence of the COVID-19 pandemic* .....	327
<b>Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Gerasimova A.A., Zhuravlev V.Yu., Mokrousov I.V.</b> Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from newly diagnosed tuberculosis patients in the Northwest of Russia* .....	342
<b>Selivanova S.G., Zverev V.V., Ponomareva N.V., Leonov A.V., Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Polyagina A.V., Novikova N.A.</b> Detection and type identification of non-polio enteroviruses in children against the background of acute intestinal infections of various etiologies: 2018–2023* .....	351
<b>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.</b> Development of a technique for molecular typing of <i>Bacillus anthracis</i> strains using new VNTR and INDEL markers* .....	362
<b>Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L.</b> Influence of <i>Yersinia pestis</i> with different plasmid composition on the erythrocyte membrane in the blood of guinea pigs. ....	372
<b>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.</b> 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
<b>REVIEWS</b>	
<b>Brusina E.B.</b> Hospital environment microbiome* .....	393
<b>Onishchenko G.G., Kirillov I.A., Borisevich S.V., Sizikova T.E., Krotkov V.T.</b> Analysis of aerobiological studies with orthopoxviruses by U.S. Department of Defense* .....	399
<b>Massino Yu.S., Tarakanova Yu.N., Segal O.L., Pechelyulko A.A., Yakovleva D.A., Lichutina M.V., Dmitriev D.A., Dmitriev A.D.</b> Monoclonal antibody techniques. 50 years of development.....	412
<b>ANNIVERSARIES</b>	
On the occasion of the 70 <sup>th</sup> anniversary of the Professor Murad Giyas oglu Mammadov.....	428

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

Konstantin V. Kuleshov<sup>1</sup>✉, Anastasia S. Pavlova<sup>1</sup>, Anna A. Kremleva<sup>2</sup>, Anna E. Karpenko<sup>1</sup>, Yuliya V. Mikhaylova<sup>1</sup>, Natalia E. Krutova<sup>1</sup>, Maria R. Lisitsyna<sup>1</sup>, Kristina R. Popova<sup>1</sup>, Olga A. Veselova<sup>1</sup>, Alexandr T. Podkolzin<sup>1</sup>, Vasily G. Akimkin<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Federal 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>



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



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

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

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

<sup>2</sup>Федеральный 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>

## Introduction

One of the epidemiologically significant serotypes of nontyphoidal salmonellae is the *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Kentucky (hereinafter referred to as *S. Kentucky*). A number of studies have described cases of isolation of strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), and in some cases even resistant to carbapenems. *S. Kentucky* is considered one of the target serotypes for monitoring prevalence in poultry production [1].

Various studies in recent years have shed light on the emergence, drivers, and potential threats of *S. Kentucky*, in particular the sequence type (ST) ST198, which readily adapts to the selection pressure exerted by antibiotic use under various environmental conditions. This *Salmonella* serotype has evolved from no resistance before 1990 to an increase in the prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in the early 21st century (from 55% in 2007 to 88% in 2017 [2, 3]). In the first years of this decade, studies record the accumulation of genetic elements responsible for resistance to a wide range of antimicrobial drugs [2]. The intensive use of antibiotics in animal husbandry and medicine is one of the primary causes of this phenomenon. Globalization of trade and travel opportunities create favorable conditions for the spread of resistant bacterial clones internationally. In Europe, human infection with the strain *S. Kentucky* ST198 multi-drug-resistant (MDR) strain was previously mainly associated with travel to North Africa or Southeast Asia, with Egypt being the most likely source of these bacterial isolates [2, 4, 5].

It is shown that all MDR strains of *S. Kentucky* ST198 belong to a single genetic lineage that has accumulated antimicrobial resistance determinants since the early 1990s. [5]. The different determinants of chromosomal resistance since the mid-1990s are associated with *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) integration. SGI1 is a 43,000 bp genomic island originally described in *S. Typhimurium* DT104 [6] and encodes resistance to a variety of antimicrobial drugs, including amoxicillin, gentamicin, and sulfonamides [7]. The insertion of SGI1 was followed by cumulative mutations in the *gyrA* and *parC* genes, leading to resistance to nalidixic acid and then to ciprofloxacin in 2002. It is assumed that it is due to the peculiarities of genetic organization — chromosome-integrated resistance — that explains the clonal success of this MDR lineage and its rapid and wide spread worldwide [5, 8]. Previous studies have demonstrated that the acquisition of SGI1 compared to the acquisition of resistance plasmids does not require the cost of adaptation (bacterial fitness) during growth under nutrient-limited conditions [9], which may directly affect the effective spread of antibiotic-resistant strains and makes it necessary to closely monitor the trends and dynamics of circulation of this pathogen not only regionally but also globally.

Existing studies based on whole genome sequencing data and population structure analysis have provided a useful basis for understanding the ongoing evolution of the MDR lineage of *S. Kentucky* ST198 [5]. MDR-lineage strains were mainly found in Egypt until 2005 and then rapidly spread throughout Africa and the Middle East [4]. Another cause for concern is the expanding range of sources of detection of MDR-lineage strains of *S. Kentucky* ST198. Initially, they were detected in autochthonous poultry, but later in various animals and food products (*Salmonella*-contaminated spices in France and the USA, turkey flocks in Germany and Poland, and wild animals) [4, 10–12].

According to salmonellosis monitoring data, *S. Kentucky* is not among the ten dominant serotypes of salmonellae in Russia. The cases of salmonella detection from various sources do not exceed 0.3% during the last year<sup>1</sup>, which corresponds to several dozens of strains per year. At the same time, according to published data, this serotype was not an etiologic agent of cases of group morbidity from 2019 to the present [13], and information about the isolation of strains of *S. Kentucky* ST198 in Russia is limited to single cases [14]. At the same time, the question of the population structure of Russian strains and their genetic characteristics in comparison with strains circulating in other regions of the world remains open.

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

## Materials and methods

### *Selection of isolates and microbiological studies*

Between 2010 and 2022, 55 strains of *S. Kentucky* isolated on the territory of the regions of the Russian Federation from various sources were studied.

### *Microbiological analysis of Salmonella strains*

Prior to total DNA extraction for whole genomic sequencing, bacterial culture was sieved to single colonies and serotype confirmation was performed using polyclonal (PETSAL) and monoclonal (Sifin) sera.

### *Whole-genome sequencing*

Total DNA from  $7 \times 10^9$  CFU was extracted using the Ribo Prep kit (AmpliSens). Genomic libraries for whole genome sequencing of each *Salmonella* strain were prepared from 70 ng of total DNA using the NexteraXT kit (Illumina). Massively parallel sequencing

<sup>1</sup> Information bulletins of the reference Center for Monitoring of Salmonellosis No. 35–26.  
URL: <https://www.epid-oki.ru/otchety.html>

was performed on MiSeq, HiSeq, and NextSeq (Illumina) platforms.

#### *Processing of whole genome sequencing data and de novo assembly of genomes*

Removal of adapters and low quality nucleotide reads was performed using the BBTtools package<sup>2</sup>. *De novo* assembly of contigs for each of the strains was performed using the SKESA assembler [15]. The number of nucleotide reads and assembly quality were considered sufficient for further analysis under the following conditions: (1) an average of more than 30-fold sequencing depth was achieved by reverse mapping the original nucleotide reads to the assembled contigs; (2) the requirements for the metrics of the obtained contigs were met<sup>3</sup>: total contig length from 4 to 5.8 million bp, N50 more than 20,000 bp, number of contigs less than 600, proportion of "N" nucleotides less than 3%, and percentage of contigs belonging to the *Salmonella* genus more than 70%. At the final stage of assembly validation, the obtained contigs were used to confirm the belonging of the sequenced strain to the serotype *S. Kentucky* using the SISTR [16] and SeqSero [17].

#### *Phylogenetic analysis*

The total collection of genomes for phylogenetic analysis included 445 genomes of *S. Kentucky* strains, including 55 strains of Russian origin (GenBank accession numbers SAMN42109132–SAMN42109186) and 390 strains sequenced in previous studies [5, 9, 18, 19]. Bioinformatic analysis was based on the search for informative single nucleotide polymorphisms (SNPs) by mapping the nucleotide reads of each of the sequenced bacterial isolates to the reference genome of *S. Kentucky* (NCBI accession number: CP028357) using the SnapperDB software pipeline [20]. The analysis was performed with the following parameters: minimum consensus depth — 10x, minimum read mapping quality to account for variation — 30x, minimum major variant fraction — 90%, minimum required genome-wide average coverage — 30x. The resulting SNP profiles were converted to alignment format. Subsequent phylogenetic tree reconstruction and removal of SNPs located in recombination regions were performed in the Gubbins v. 3.2.1 program [21]. Bootstrap analysis with 1000 repetitions was performed to confirm the tree topology. Phylogenetic sublineages (genetically homogeneous groups of SNP profiles) were determined using the Fastbaps program with the parameters "optimize\_baps". As a result, the clusters identified at the first level of clustering were used [22].

#### *Determination of sequencing type, genetic determinants of antibiotic resistance and plasmid replicons*

ST based on 7 housekeeping genes were determined using mlst program<sup>4</sup>. Antibiotic resistance genes and point mutations were searched using AMRFinder-Plus v. 3.10.40 with the parameters "-I 0.9 -c 0.6 -O Salmonella" (minimum percentage of identity — 90%, minimum overlap — 60% with filtering of results specific to the *Salmonella* genus) [23]. Plasmid type determinations were performed using the MOB-suite v. 3.0.0 program [24].

#### *SGI1 analysis*

We determined the presence and analyzed the putative structure of the SGI1 island by mapping the short nucleotide reads of each genome to the SGI1-K reference sequence (NCBI database access number AY463797.8). In the comparison set, we also included the genomes of *S. Kentucky*, which were characterized by different SGI1-K island variants, as well as other derived SGI1-K island variants, SGI1-P and SGI-Q [5].

## Results

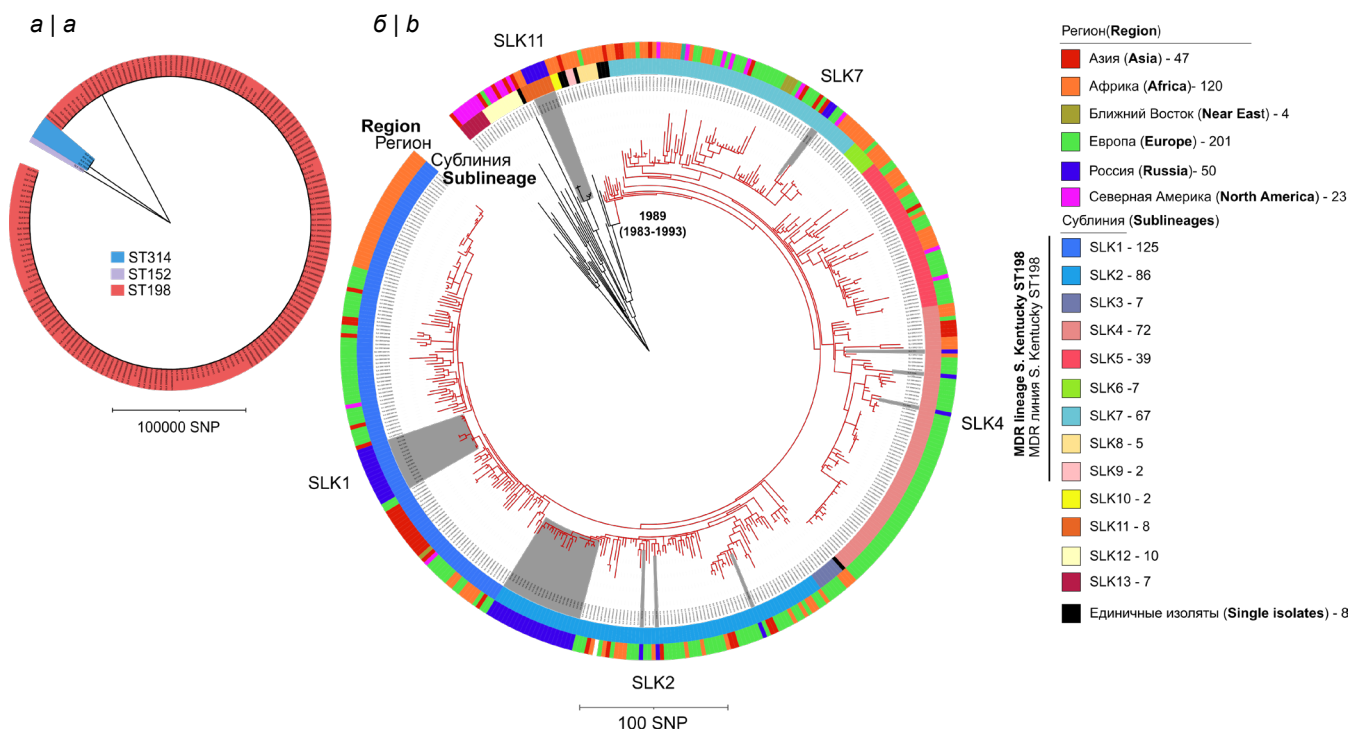
According to the results of the analysis, the majority of strains ( $n = 50$ ) belonged to ST198 (90.9%), 4 (7.3%) strains were represented by ST314 and only 1 (1.8%) strain was ST152. Strains with these STs belonged to separate phylogenetic lineages with a high level of genetic divergence at the level of core SNP indicating the polyphyletic nature of this serotype, i.e., the ancestral strains of these STs evolutionarily acquired the same O-antigens through convergent evolution (**Fig. 1, a**) [25]. Since the majority of the Russian strains belonged to the ST198 genotype, further analysis focused on the detailed analysis of this group. For comparison, we used the previously sequenced genomes of *S. Kentucky* ST198 that are deposited in international databases ( $n = 390$ ). These strains were characterized by a wide time-frame (1937–2022), geographic range of strain isolation (5 continents), and belonged to diverse sources (human, food, animal and environmental).

Phylogenetic analysis of 440 ST198 strains allowed us to identify 13 sublineages (BAPS genetic clusters) represented by more than 1 strain. At the same time, 9 sublineages belonged to the international monophyletic MDR lineage of *S. Kentucky* ST198, and 4 occupied a basal position relative to it (**Fig. 1, b**). The basal clades of each sublineage of the international MDR clone included strains isolated in African countries, supporting the hypothesis of the origin of the MDR lineage *S. Kentucky* ST198 on the African continent and subsequent spread throughout the world.

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

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

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



**Fig. 1.** Maximum likelihood phylogenetic tree.

**a** — 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.

Of the 50 Russian ST198 strains, 44 strains belonged to the international monophyletic MDR lineage *S. Kentucky* ST198 and belonged to 4 separate sublineages (SLK-1, SLK-2, SLK-4, SLK-7), while 6 strains belonged to the SLK-11 sublineage and occupied a basal position in relation to the MDR lineage of *S. Kentucky* ST198 (Fig. 1, b). The largest number of Russian strains of *S. Kentucky* ( $n = 25$ ) belonged to the SLK-2 sublineage, the smallest – to the SLK-7 sublineage ( $n = 2$ ). Note that the SLK-4 sublineage was mainly represented by strains from Europe.

Phylogenetic analysis and geographical region of isolation of *S. Kentucky* strains in Russia did not reveal any correlations. At the same time, Russian strains of the SLK-2 sublineage are characterized by predominant isolation in the North Asian part of Russia (Omsk and Irkutsk regions, Republic of Buryatia, Krasnoyarsk and Altai krais), while for the SLK-11 sublineage – in European Russia (Moscow and Tula regions), and strains belonging to sublineages SLK-1, SLK-7 and SLK-4 were found in both territories.

Analysis of genetic clustering of Russian strains of *S. Kentucky* at the level of differences within 5 SNPs allowed us to identify 6 t5-SNP clusters that belonged to 3 sublineages (Fig. 2). Two t5-clusters were associated with the SLK-2 sublineage. One of the t5-clusters included 8 strains that were isolated from differ-

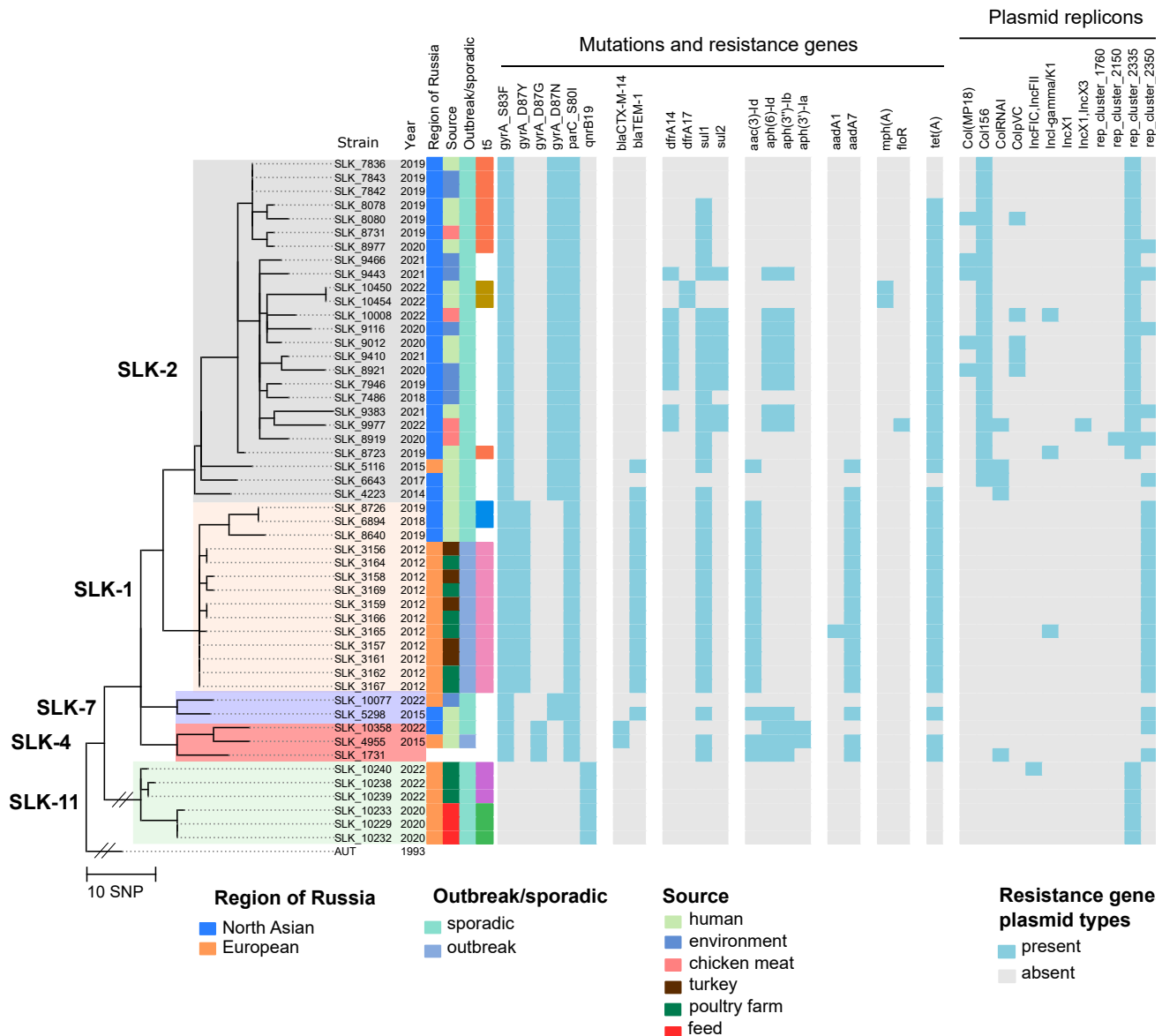
ent sources (human, environmental and food) during 2019–2020. The second cluster included 2 strains isolated from humans in 2022.

Russian strains of *S. Kentucky* SLK-1 sublineage strains also included 2 separate t5-SNP clusters, to which 14 strains belonged. The first cluster included 12 strains isolated from the environment of the poultry farm and turkey during the enzootic of salmonellosis in poultry, thus confirming the clonal relationship of salmonella cases detected at the poultry farm. The second cluster included 2 sporadic strains from humans in 2018 and 2019.

SLK-11 sublineage was characterized by 2 t5-SNP clusters: 1 cluster was for strains isolated from turkey feed in 2020 and the other cluster was for strains isolated from turkey litter at the poultry farm in 2022.

#### *Genetic determinants of S. Kentucky ST198 antibiotic resistance and plasmid diversity*

All ST198 strains isolated in Russia contained genes or mutations responsible for antibiotic resistance. Moreover, 62% of the strains contained a total of 6–11 resistance genes. A total of 320 genes and mutations responsible for antimicrobial resistance were identified among the 50 strains. The most frequent point mutations were in the QRDR region determining resistance to quinolones, namely in the *gyrA* (S83F) genes —



**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.

13.8% and *parC* (S80I) — 13.8%. The *tetA* tetracycline resistance gene was found in 11.9% of strains. The *bla*<sub>TEM-1</sub>, *aac*(3)-*Id* and *aadA7* genes were present in 5% of strains.

When analyzing various combinations of genetic determinants of resistance, 14 combinations were found. The most frequent (26%) was the combination *gyrA*(S83F, D87Y)-*parC*(S80I)-*bla*<sub>TEM-1</sub>-*sul1*-*aac*(3)-*Id*-*aadA7*-*tet*(A), *gyrA*(S83F, D87N)-*parC*(S80I)-*sul1*-*tet*(A) and *gyrA*(S83F, D87N)-*parC*(S80I)-*dfrA14*-*sul1*-*sul2*-*aph*(6)-*Id*-*aph*(3'')-*Ib*-*tet*(A) combinations ranked 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> in frequency of occurrence (8% each).

The nature of the set of identified resistance genes and mutations was reasonably consistent with the phylogenetic clustering of the strains studied. All strains of SLK-2 sublineage were characterized by the presence of 3 chromosomal mutations (*gyrA* (S83F, D87N) and *parC*(S80I)), and the genes *dfrA14*, *sul1*, *sul2*, *aph*(6)-*Id*, *aph*(3'')-*Ib* and *tetA* were found in the majority of strains. At the same time, *bla* and *aadA* genes were absent in the group of SLK-2 strains after 2015 in comparison with others.

Russian strains of SLK-1 also carried 2 mutations in the QRDR region, *gyrA*(S83F) and *parC*(S80I), but

differed from SLK-2 by a mutation in the *gyrA*(D87Y) gene. All strains carried the same set of resistance genes *bla*<sub>TEM-1</sub>-*sul1-sul1-aac(3)-Id-aadA7-tet(A)*.

The 2 strains of SLK-7 sublineage, like SLK-2, were characterized by similar mutations in the *gyrA*(S83F, D87N) and *parC*(S80I) genes. At the same time, strain SLK\_5298 included the entire set of genes characteristic of the SGI1-K genomic island (*bla*<sub>TEM-1</sub>-*sul1-aac(3)-Id-aph(6)-Id-aph(3'')-Id-aph(3''')-Ib-aadA7-tet(A)*) [19], and strain SLK\_10077 was characterized by the absence of resistance genes.

SLK-4 sublineage strains were characterized by set of mutations in *gyrA*(S83F, D87G) and *parC*(S80I). Moreover, 2 strains (SLK\_10358 and SLK\_4955) carried the *bla*<sub>CTX-M-14</sub> gene, in addition to other genes encoding antibiotic resistance.

In comparison with the other strains, only the plasmid-mediated resistance gene *qnrB19* was detected in representatives of the SLK-11 sublineage. No mutations in the QRDR-region and other resistance genes were detected.

Analysis of plasmid diversity allowed us to determine the presence of 13 known types of plasmid incompatibility among sequenced Russian isolates. Col156, rep\_cluster\_2335 and rep\_cluster\_2350 were the most frequent. The greatest diversity of plasmids was characteristic of SLK-2 sublineage strains, which, in addition to the above-mentioned plasmids, included IncX, Inc-gamma and ColpVC groups.

### *SGI1 genomic island analysis*

The presence of SGI1 island genes in the sequenced genomes was considered as evidence of SGI1 embedding into the bacterial chromosome, namely in the region from the 3'-end of the *trmE* gene to the 5'-end of the *gidY* gene. The results of SGI1-K reference sequence overlap analysis for Russian *S. Kentucky* strains are presented in **Fig. 3**.

The main differences in SGI1-K variants consist in the variation not only in the composition of the island genes, but also in the set of transposons. In particular, the reference SGI1-K carries a set of 5 transposons *Int4-Tn21-Tn1721-Tn5393-Tn3*, while the previously described SGI1-K variant in strain 08-KS6 is characterized by the absence of transposon *Tn5393* and shortened variants of transposon *Tn1721* (*Int4-Tn21-ΔTn1721-Tn3*), strain 08-5707 has a shortened *Tn5393* transposon (*Int4-Tn21-Tn1721-ΔTn5393-Tn3*), and strain 07-1511 has only 3 transposons (*Tn1721-Tn21-Tn3*) with region inversion.

The SLK-11 sublineage strains were characterized by the absence of both SGI1 island genes and mobile genetic elements *Int4*, *Tn21*, *Tn1721*, and *Tn3*, which are characteristic of SGI1-K, indicating the absence of SGI1 island integration into the chromosome.

For strains of SLK-2 sublineage, the SGI1-K reference sequence overlap ranged from 19% to 61%. At

the same time, most strains were characterized by the absence of the main part of the backbone genes in the range from the *S005* gene to the *resG* gene and the presence of transposons *Int4*, *Tn21*, *Tn1721* carrying resistance genes. SLK\_7836, SLK\_7843 and SLK\_7842 strains, which lacked mobile elements, were also characterized by the absence of antibiotic resistance genes. SLK\_6643 strain was characterized by a similar pattern of reference sequence overlap with SGI1-K. In turn, SLK\_5116 and SLK\_4223 strains were similar to the SGI1-K 08-5707 variant with a deletion of the bark *traG-resG* genes and a set of *Int4-Tn21-Tn1721-Tn3* mobile elements.

All SLK-1 sublineage strains had a similar composition of SGI1 island genes and 90% overlap of the SGI1-K reference sequence. The set of mobile elements, including *Int4-Tn21-Tn1721-Tn3*, was similar to the SGI1-K variant described previously in strain 08-KS6.

In the SLK-7 sublineage, strain SLK\_10077 was characterized by 60% percent overlap of the reference sequence due to the presence of island genes and absence of mobile elements, which correlated with the absence of resistance genes in the contig analysis. At the same time, the nucleotide reads of strain SLK\_5298 overlapped the reference sequence SGI1-K by 100%.

SLK-4 sublineage strains were characterized by different variants of SGI1. For example, strain SLK\_10358 (61% overlap) was characterized by the presence of all island genes, while only transposon *Tn5393* was present among mobile elements. SLK\_4955 (87% overlap) and SLK\_1731 (85% overlap) strains were characterized by a similar set of *Int4-Tn21-Tn1721-Tn539* transposons. However, SLK\_1731 lacked the SGI1 island genes (*S025-resG*).

## Discussion

The epidemiologic significance of *S. Kentucky* serotype is due to its potential for spread, adaptability to various environmental conditions, and genetic mechanisms, including chromosomal and plasmid-mediated, which allow resistance to a wide range of antimicrobial drugs to be realized. Along with a high proportion of strains resistant to ciprofloxacin, cases of combined resistance to ciprofloxacin and cefotaxime (III generation cephalosporins) have been registered. In particular, strains with combined resistance were registered on the island of Malta and belonged to bacterial isolates producing ESBL [26]. *S. Kentucky* strains with genes for ESBL (CTX-M-1, -M-14, -M-15, -M-104), cephalosporinase AmpC beta-lactamases (CMY-2 and -4), and carbapenemases (VIM-2, OXA-48, NDM-1) localized not only on plasmids but also in the SGI1 chromosomal region [4, 5, 19, 26–29]. Although salmonellosis is considered a strictly zoonotic infection, there have been suggestions of the spread of some epidemic clones of *S. Kentucky* from human to human and that humans are a reservoir [18].



**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.

To date, there are 10 different STs of *S. Kentucky*, 3 of which (ST198, ST152, and ST314) are the most frequent [30]. In certain cases, different representation of these STs has been noted, both territorially (international differences) and in relation to the sources of *Salmonella* isolation [31, 32]. However, the predominance of ST198 and ST152 in humans and poultry has been noted [33]. In our study, more than 90% of the strains associated with different isolation sources were ST198 and ST152 was represented by a single strain, which is consistent with international data.

The use of whole genome sequencing is the gold standard and universal tool for genomic surveillance of socially important pathogens [34, 35]. The possibility of hierarchical clustering of phylogenetically significant markers of a certain pathogen at different levels of detail and comparison with sequences deposited in international databases not only provides valuable information on evolutionary trends and assessment of pathogen spreading factors on a global scale, but also makes it possible to determine clonal and familial relationships between strains for epide-

miological investigation of outbreak and sporadic morbidity [36–38].

According to the phylogenetic analysis, the majority of ST198 strains circulating in Russia belonged to 4 major sublineages of the international monophyletic MDR lineage of *S. Kentucky* ST198, which includes strains with MDR phenotype to antimicrobials [5]. A majority of Russian strains belonged to phylogenetic sublineages SLK-1 and SLK-2. At the same time, the long period of isolation of strains from different sources belonging to these two sublineages may indicate the presence of two established and genetically distinct subpopulations of the MDR-lineage of *S. Kentucky* ST198 on the territory of Russia. It is interesting to note that the character of phylogenetic clustering into separate sublineages coincided with a certain combination of 3 mutations in the *gyrA* and *parC* genes, determining resistance to quinolones, which allows us to use them as markers for differentiation of Russian *S. Kentucky* ST198 strains into the main phylogenetic sublineages.

Two strains of the SLK-4 sublineage, SLK\_10358 (Irkutsk, sporadic case in 2022) and SLK\_4955 (a re-

representative strain from a salmonellosis outbreak in Izhevsk in 2015), were representatives of the phylogenetic sublineage that has been associated with the *S. Kentucky* population established since 2005 in European countries [18]. The peculiarity of these ciprofloxacin-resistant *S. Kentucky* strains is the presence of the *bla*<sub>CTX-M-14</sub> gene integrated into the chromosome, encoding ESBL [18]. This gene was also detected in Russian strains of SLK-4 sublineage. Cases of isolation of such strains may indicate single and independent cases of introduction of strains of *S. Kentucky bla*<sub>CTX-M-14</sub> from the territory of the EU countries, but this assumption requires investigation of an expanded sample of strains.

The data obtained, based on the identification of genetically similar strains, using a clustering approach at a level not exceeding 5 nucleotide variations between strains (t5-SNP cluster), revealed 6 groups of clonally related strains within 3 sublineages of Russian *S. Kentucky* ST198 strains. The size of the groups varied from 2 to 11 strains. In most cases, the identified t5 clusters were associated with the circulation of a particular clone of *S. Kentucky* ST198 in a limited area and in a relatively short period of time (not more than 1 year): in an epizootic outbreak of salmonellosis at a turkey poultry farm in Tula region (2012); detection of salmonella strains in turkey litter at a poultry farm in Moscow region (2022); in mixed feed for turkeys in the Moscow region (2022); and in 2 independent cases of salmonellosis in humans in Angarsk and Irkutsk in 2022. At the same time, our studies demonstrate the possibility of the existence of latent circulation of a certain clone of *S. Kentucky* ST198 with strains detected in 2019 and 2020 in Omsk ( $n = 7$ ) and Irkutsk ( $n = 1$ ), which were associated with sporadic cases of salmonellosis and isolation of salmonellae from environmental objects and from food products, thus indicating a probable epidemiologic linkage.

The approach used in our study to analyze the structure of the SGI1 genomic island allowed us to indirectly assess its composition and demonstrate the sensitivity of this genomic region to genetic rearrangements caused by the activity of transpositional elements [5, 9, 19]. These rearrangements can lead to the deletion of some or all genes within SGI1 [5]. In most cases, Russian strains are characterized by the presence of SGI1-K variants. Nevertheless, in a number of genomes, the detected set of transposons differed from the existing SGI1 variants, which probably indicates the presence of a new variant of the genomic island. High variation of this island was also observed in previous studies, where almost every strain was characterized by a different SGI1 structure. In addition to large deletions of the SGI1 island, some strains had inversions of all or part of the segment including resistance genes, as well as transposon rearrangements [5].

The analysis of SGI1 organization and phylogenetic clustering of strains based on the analysis of SNP profiles generally correlated with each other for differ-

ent SLK sublineages. However, in SLK-2 strains belonging to the same t5-SNP cluster, the SGI1 structure showed differences in set of transposons. Such discrepancies may indicate a high rate of genetic rearrangements of the SGI1 region in clonally related strains and explain the difference in antibiotic resistance gene set.

The presence of SGI1 correlated with the detected antibiotic resistance gene set. Most strains (86%) were characterized by the presence of *aadA7*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *sull* and *tetA* genes, which are known to be associated with SGI1 in *S. Kentucky* ST198 strains [19].

Collectively, the antimicrobial resistance genes identified were responsible for resistance to various classes of antibiotics, including aminoglycosides,  $\beta$ -lactams, phenicols, quinolones, sulfonamides and tetracyclines. Based on the data obtained, there is still uncertainty about the association of certain resistance genes with the detected plasmid type due to the lack of completed genome assembly. However, the data obtained on the diversity of plasmid types indicate their ability to transfer resistance genes. It has been shown that the small ColRNAI plasmids, rep\_cluster\_2335 and rep\_cluster\_2350 can successfully carry a diverse range of resistance genes, such as *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *ac(3)-IIa*, *strB*, *strA*, *aadA16*, *qn-rB66*, *oqxA* and *oqxB* [39–42].

## Conclusion

Despite the relatively small sample of strains, we were able not only to come closer to understanding the population structure of Russian *S. Kentucky* ST198 strains on a global scale, but also to conduct a detailed study of the genetic determinants of antibiotic resistance, including the structure of the SGI1 genomic island. The findings provide a basis for understanding and tracking the ongoing evolution of the MDR lineage, which is a globally distributed clone capable of rapid expansion and accumulation of antimicrobial resistance determinants. Our data demonstrate instances of circulating clonally related *S. Kentucky* ST198 strains in different sources, which indicates the need to develop an integrated approach to salmonellosis surveillance based on the One Health concept.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. 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>
2. 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)
3. 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>



4. 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>
5. 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>
6. Bie L., Fang M., Li Z., et al. Identification and characterization of new resistance-conferring SGIs (*Salmonella* genomic island 1) in *Proteus mirabilis*. *Front. Microbiol.* 2018;9:3172. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03172>
7. Doublet B., Golding G.R., Mulvey M.R., Cloeckeaert 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>
8. 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>
9. Cohen E., Davidovich M., Rokney A., et al. Emergence of new variants of antibiotic resistance genomic islands among multidrug-resistant *Salmonella enterica* in poultry. *Environ. Microbiol.* 2020;22(1):413–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14858>
10. 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/tmxvqm>
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., Kruczkiewicz 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  $\beta$ -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., Sakomoto 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., Tijmsma 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 England 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. Lermينياux 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>
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*<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of enteric infections, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, [konstantinkul@gmail.com](mailto: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

**Информация об авторах**

*Кулешов Константин Валерьевич*<sup>✉</sup> — к.б.н., зав. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, [konstantinkul@gmail.com](mailto: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



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

Yury V. Lobzin<sup>1,2</sup>, Konstantin D. Ermolenko<sup>1✉</sup>, Maria A. Makarova<sup>2,3</sup>, Lidia A. Kaftyreva<sup>2,3</sup>, Elvira A. Martens<sup>1,2</sup>, Dmitry E. Polev<sup>3</sup>, Elena I. Ermolenko<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia;

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

<sup>4</sup>Institute 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 $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ).

**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 *flgE*<sup>+</sup>, *cdtA*<sup>+</sup>, *cdtC*<sup>+</sup> 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>

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

## Кампилобактериоз: генотипическая характеристика возбудителя и иммунологический статус пациентов

Лобзин Ю.В.<sup>1,2</sup>, Ермоленко К.Д.<sup>1✉</sup>, Макарова М.А.<sup>2,3</sup>, Кафтырева Л.А.<sup>2,3</sup>, Мартенс Э.А.<sup>1,2</sup>, Полев Д.Е.<sup>3</sup>, Ермоленко Е.И.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия;

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

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

<sup>4</sup>Институт 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». Иммунологический 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 $\beta$ , -1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерферона- $\gamma$ .

**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 *flgE*<sup>+</sup>, *cdtA*<sup>+</sup>, *cdtC*<sup>+</sup> сопровождалось статистически значимым повышением уровня интерлейкина-8, понижением 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>

## Introduction

*Campylobacter* spp. are one of the leading causative agents of acute intestinal infections (AII) in developed countries, exceeding in some regions the frequency of salmonellosis and escherichiosis registration. They are the cause of one third of cases of “travelers' diarrhea” among residents of industrial countries visiting regions with high levels of *Campylobacter* spp. circulation [1]. According to the latest WHO data, campylobacteriosis is one of the most common foodborne infectious diseases. Campylobacteriosis is being registered in all age groups, more often in children aged 1 to 5 years. Relative increase in disease cases is observed in older children and young people (compared to other age categories). Thermophilic *Campylobacter* species (TC) *C. jejuni* and *C. coli* [2] are of greatest importance in human infectious pathology, as they are characterized by a variety of genetic determinants that influence the pathogenetic and clinical features of the disease.

Unlike other pathogens of acute intestinal infections of a bacterial nature, thermophilic *Campylobacter* spp. are considered one of the most difficult microorganisms to cultivate, requiring special conditions and equipment. The isolation of a pure culture of the pathogen from stool samples for campylobacteriosis laboratory diagnosis is challenging due to their massive concomitant microbial contamination. In this regard, information on the incidence of this infection is fragmentary and does not provide a complete picture of its real spread [3, 4]. In recent years, the use of molecular research methods was considered not as an alternative, but as a mandatory addition to regulated diagnostic schemes for acute intestinal infections, allowing for the rapid and effective identification of pathogens of acute intestinal infections, including thermophilic *Campylobacter* spp. At the same time, it does not imply species identification and determination of sensitivity to antimicrobial drugs.

It is known that most *Campylobacter* spp. are resistant to the action of bile [5] and have the ability to colonize all parts of the intestine causing inflammation, edema, hyperplasia of the mucous membrane and erosions [6]. The pathogenic properties of campylobacteria are largely determined by their mobility, ability to adhere, invade and produce toxins. The flagella of campylobacteria determine their motility and movement along the epithelium [7, 8]. Adhesion and penetration of enterocytes contributes to the destruction of the intestinal mucosa, a pronounced inflammatory reaction and the development of hemorrhagic colitis [9]. Severe forms of campylobacteriosis are associated with the production of heat-stable and/or heat-labile enterotoxins and/or endotoxin (cell wall lipopolysaccharide), which affect the absorption of fluid and electrolytes, determining the development of diarrhea [10].

*Campylobacter* spp. genotyping methods are very important for epidemiological analysis allowing to

identify “epidemic clones” — virulent strains capable of widespread distribution [11]. The study of the dominant genotypes of *Campylobacter* spp. can significantly supplement epidemiological monitoring, providing important information about the sources of infection, current transmission factors, and also assess the extent of the spread of resistance to antibacterial drugs [12]. It also cannot be ruled out that determining the genotype of the causative agent of campylobacteriosis may help clarify the prognosis of the severity of the infectious process and select the optimal drug therapy regimen [13].

Many researchers suggest that clinical manifestations of campylobacteriosis are largely due to the body's immune response [14]. Immunopathological reactions also predetermine numerous post-infectious complications, in particular, the development of Guillain-Barré syndrome, reactive arthritis and irritable bowel syndrome [15]. The variety of clinical forms and complications of campylobacteriosis determines special interest in the study of its pathogenesis, including the characteristics of the body's immune response to this disease [16, 17]. At the same time, the severity of the infectious process and the formation of long-term complications can be determined by the genotype of the pathogen, the biological properties of which influence the parameters of the immune response [18]. That is why the features of the spread of epidemic clones, the association of the pathogen genotype with the severity of the disease and the immune response are of undoubted interest.

**The purpose** of this study was to detect the most common genotypes of epidemic campylobacteria clones and assess the nature of the immune response and the severity of the disease, taking into account the genotypic characteristics of pathogen.

## Materials and methods

The study included 203 patients aged from 1 month to 17 years (mean age  $4.8 \pm 1.2$  years) with a diagnosis of the underlying disease campylobacteriosis, treated in 2019–2021 at the PRCID clinic. The study was carried out with voluntary informed consent from the legal representatives of minor patients. The documentation and design of the study were approved at a meeting of the Local Ethics Committee at the FMBA (Protocol No. 11 of 03/05/2019).

To assess the severity of campylobacteriosis, the Clarke scale was used based on a score of the severity and duration of fever, diarrhea syndrome, vomiting and the general condition of the patient (**Table 1**). A score of more than 16 points corresponded to the severe form of campylobacteriosis.

The diagnosis of campylobacteriosis was confirmed based on the results of studies of stool samples using the polymerase chain reaction method with hybridization-fluorescence detection using the AmpliSens AII screen-FL reagent kit (Central Research Institute

**Table 1.** Clarke scale for assessing the severity of acute intestinal infections in children

Severity criterion	Severity of disease manifestations		
	1 point	2 points	3 points
Number of bowel movements per day	2–4	5–7	> 8
Duration of diarrhea, days	1–4	5–7	> 8
Number of vomiting episodes per day	1–3	4–6	> 7
Duration of vomiting, days	2	3–5	> 6
Increase in body temperature, °C	37,1–38,2	38,3–38,7	> 38,8
Duration of fever, days	1–2	3–4	> 5
Changes general state	Agitation or refusal to play	Lethargy or apathy	Convulsions or a loss of consciousness
Duration of conservation pathological behavioral symptoms, days	1–2	3–4	> 5

of Epidemiology of Rospotrebnadzor) for the detection and differentiation of DNA (RNA) of microorganisms of the genus *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. (thermophilic), *Adenovirus* (group F), *Rotavirus* (group A), *Norovirus* (genotype 2) and *Astrovirus*. Samples in which fluorescence levels were consistent with genetic determinants of thermophilic *Campylobacter* spp. were studied by the cultural method according to the Guidelines “Microbiological diagnosis of campylobacteriosis” No. 01/15702-8-34. To isolate *Campylobacter strains* spp., the following nutrient media were used: Columbia agar containing sheep blood (Sredoff LLC) and charcoal agar with a selective additive (Oxoid). Inoculation on nutrient media was carried out using cellulose acetate filters (Sartorius) with a pore diameter of 0.45 µm. *Campylobacter* cultivation was carried out under microaerophilic conditions at 42°C for 48 hours using CO2GEN gas-generating packages (ThermoFisher).

For species identification, traditional routine tests were used based on the determination of key phenotypic characters: cell morphology and relation to Gram staining, cytochrome oxidase and catalase production, hydrolysis of sodium hippurate and indoxyl acetate, as well as MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonik MALDI Biotyper).

Total DNA from bacterial strains was isolated using the QIAam p kit DNA Mini Kit (Qiagen). Whole-genome DNA sequencing was performed using the MiSeq (Illumina) and DNBSEQ-G50 (MGI) sequencing platforms with read lengths of 2×300 and 2×100. Raw readings were processed by Trim Galore v.0.6.7 program to remove adapter sequences and trim for quality. Processing quality control was carried out using the FastQC v.0.11.9 program. The genomes were assembled *de novo* using SPAdes assembler v.3.13.1 software. The assembly results were evaluated in QUAST v.5.2.0 program. The search for genetic

determinants encoding virulence factors and MLST typing were carried out using the online resource platform Center for Genomic Epidemiology<sup>1</sup>.

The study of immune status was carried out on the 1<sup>st</sup> and 7<sup>th</sup> days of the disease. The immunological study included the quantitation of serum immunoglobulins (Ig) classes A, M, G, C-reactive protein, cytokines: interleukin (IL) -1β, -1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, tumor necrosis factor-α and interferon γ. The concentration of serum IgA, IgM, IgG and cytokines was assessed using an enzyme-linked immunosorbent assay (Vector-Best-Baltika). Fecal calprotectin (a non-invasive marker of neutrophilic intestinal inflammation) in stool samples was determined using a sandwich version of an enzyme-linked immunosorbent assay (R-Biopharm AG).

Statistical processing of the obtained data was carried out using the Statistica program for Windows v.10" (StatSoft). Quantitative indicators were assessed by compliance with the normal distribution using the Shapiro–Wilk criteria (for the number of subjects less than 50) and the Kolmogorov–Smirnov criterion (for the number of subjects more than 50). Quantitative indicators with a normal distribution were combined into variation series, in which arithmetic means (M) and standard deviations (SD) were calculated. Sets of quantitative indicators, the distribution of which differed from normal, were described using the values of the median and the lower and upper quartiles Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]. When comparing average values in normally distributed sets of quantitative data, the Student t-test was used; when comparing independent sets in cases where there were no signs of normal distribution of data, the Mann–Whitney U test was used.

<sup>1</sup> Center for Genomic Epidemiology.

URL: <http://www.genomicepidemiology.org/services>

## Results

### *Clinical and laboratory data*

The average severity of campylobacteriosis on the Clark scale was  $12.6 \pm 1.6$  points. The severity of campylobacteriosis was assessed as moderate in 156 (76.85%) children, severe in 35 (17.24%), and mild in 12 (5.91%). Changes in the hemogram on the 1<sup>st</sup> day were characterized by neutrophilic leukocytosis in the range of  $15\text{--}35 \times 10^9$  cells/l and acceleration of ESR in the range of 20–40 mm/h. During repeated studies on the 7<sup>th</sup> day, 16 (7.88%) patients still had minor deviations of hemogram parameters from normal values. An increase in the level of C-reactive protein was detected in 70.44% of patients. A strong positive correlation was established between the severity of campylobacteriosis, the total level of leukocytes ( $r = 0.56$ ;  $p = 0.047$ ) and C-reactive protein ( $r = 0.63$ ;  $p = 0.016$ ). Analysis of the levels of fecal calprotectin revealed a tendency towards its lower content in the blood serum of patients with a moderate form of the disease, compared to the severe form —  $120.59 \pm 47.21$  and  $242.80 \pm 105.99$   $\mu\text{g/g}$ , respectively ( $p > 0.05$ ).

### *Immunological status of patients with campylobacteriosis*

The study of cytokine status showed that the level of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  were within the reference values and did not differ significantly in patients with different degrees of campylobacteriosis severity. The most significant results were obtained when analyzing the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , -6, -8 and regulatory IL-10 (**Fig. 1**).

On the 1<sup>st</sup> day of the disease, an increase in the level of IL-1 $\beta$  was detected in patients with moderate and severe forms of campylobacteriosis, IL-6 — only in patients with severe forms. The concentrations of these cytokines decreased by the 7<sup>th</sup> day of the disease, but only IL-6 levels reached normal reference values. Despite the fact that the level of IL-8 in a significant proportion of patients (44.1%) on the 1<sup>st</sup> day was within the reference values, there was a statistically significant increase in this indicator in patients with severe campylobacteriosis compared with the rest children ( $p = 0.002$ ). An increase in this marker on the 1<sup>st</sup> day of the disease was one of the most significant predictors of severe campylobacteriosis (OR =  $7.6 \pm 1.7$ ;  $p < 0.001$ ). A strong correlation was found between the level of IL-8 and the severity of campylobacteriosis ( $r = 0.781$ ;  $p = 0.006$ ). By the 7<sup>th</sup> day of the disease, this indicator decreased in all patients, but in severe cases of campylobacteriosis remained significantly higher than normal.

The regulatory cytokine IL-10 in all patients on the 1<sup>st</sup> day of the disease did not exceed the reference values. At the same time, on the 7<sup>th</sup> day, this indicator significantly exceeded reference level in patients with

severe campylobacteriosis, which can be explained by a compensatory reaction of the body aimed at preventing the development of allergic and autoimmune processes.

A study of the concentrations of Ig, IgM and IgG on the 1<sup>st</sup> day of the disease showed that, regardless of the severity of the infection, they were within the reference values. By day 7, there was an increase in the average level of immunoglobulins, statistically significant for IgA and IgM ( $p = 0.003$  and  $p = 0.021$ , respectively). Both classes of immunoglobulins are produced during the acute period of the immune response, which appear in the blood upon first contact with infection.

Thermotolerant *Campylobacter* spp. were isolated by cultural method in 48 out of 203 studied stool samples from 28 children with gastroenteric and 20 with enterocolitic variants of campylobacteriosis, of which 6 (12.50%) had a mild disease, 30 (62.50%) had a moderate course and 12 (25.00%) — severe disease. Species identification revealed that 32 strains belonged to the species *C. jejuni*, 16 strains belonged to *C. coli*.

### *Frequency of detection of campylobacter virulence genes*

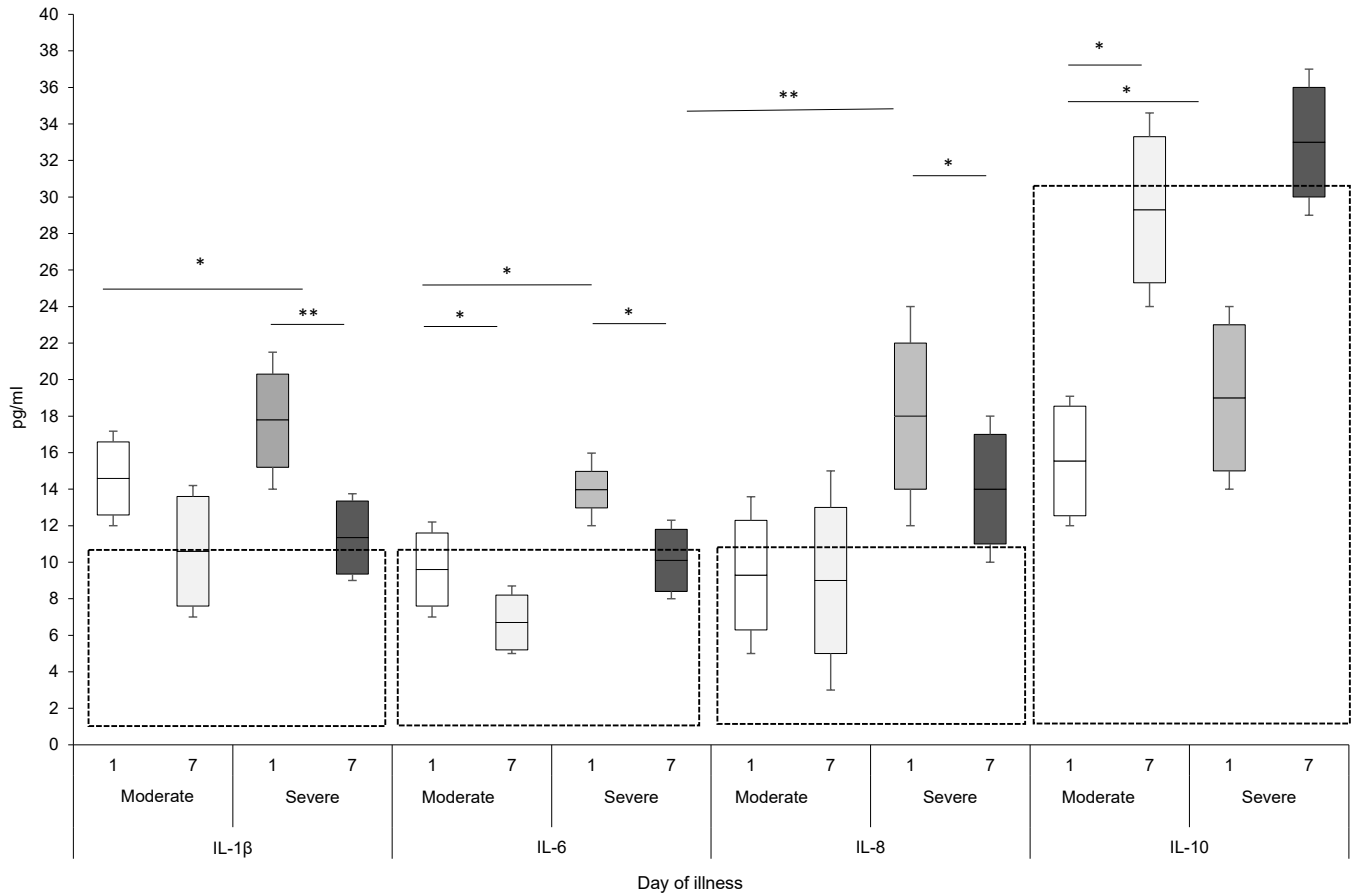
Key virulence genes responsible for chemotaxis, adhesion and colonization, invasion, morphogenesis of flagella and capsule, production of toxins and siderophores were present in all isolated strains of *C. jejuni* and *C. coli* (**Table 2**).

Analysis of genetic determinants of pathogenicity showed that genes associated with motility (*flaA*, *flaB*, *flhA*, *flhB*, *flgB*, *flgE*, *fliM*, *fliY*), adhesion (*cadF*, *dnaJ*, *jlpA*, *pldA*, *racR*, *virB11*), colonization (*cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*), invasion (*iamA*, *ciaB*, *ceuE*), synthesis of toxins (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*), capsule (*kpsM*) and siderophores (*cfrA*, *Fur*) without statistically significant differences were found in *C. jejuni* and *C. coli* strains.

The prevalence of genes encoding flagellin synthesis, according to the total data, ranged from 62.50% (*flaB*) to 100% (*flaA*, *flgB*, *fliM*, *fliY*). Analysis of the results of detection of genes associated with adhesion showed that all strains contained the *dnaJ* gene. No statistical differences in the presence of genetic determinants encoding the ability to chemotaxis were detected. All strains were characterized by the presence of the *cdtB* gene, responsible for the production of a cytotoxic toxin involved in the suppression of the proliferation of enterocytes with their subsequent death. Invasion-associated genes *iamA*, *ciaB*, *ceuE* were identified in 91.67, 87.50, 83.33% of *Campylobacter* strains spp., respectively. Analysis of the presence of genetic virulence determinants encoding the synthesis of the capsule and siderophores did not reveal significant differences in the strains of *C. jejuni* and *C. coli*.

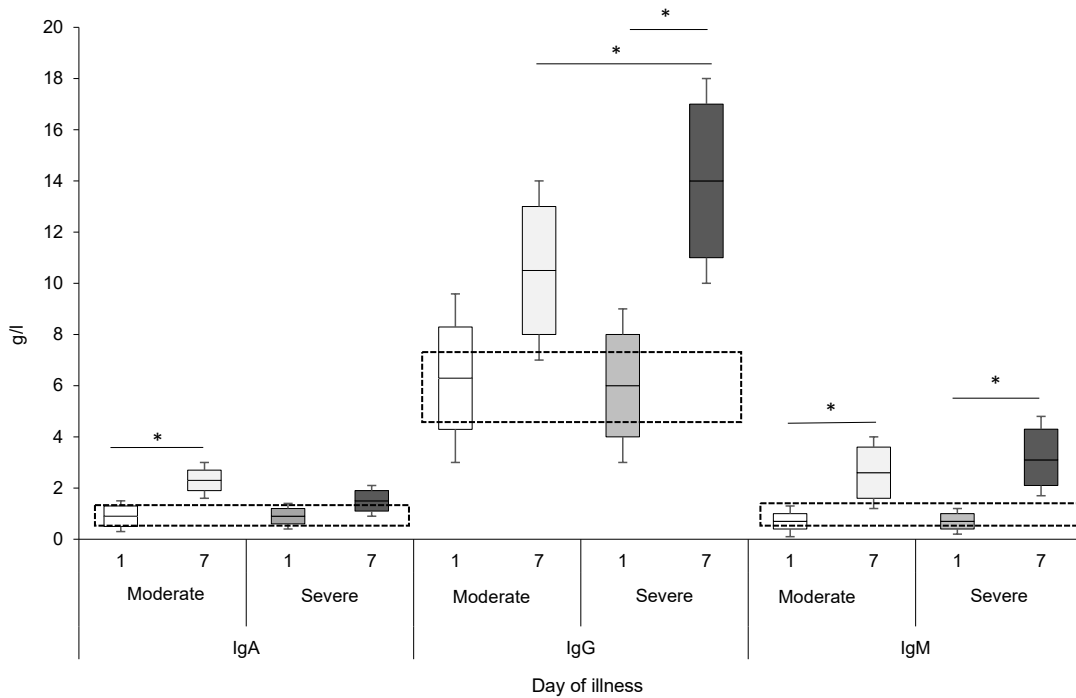
*Campylobacter* spp. characterized by virulence genotype *flgE*<sup>+</sup>, *cdtA*<sup>+</sup> and *cdtC*<sup>+</sup> was found in 83.3% of patients with severe campylobacteriosis. According to





**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.



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

**Table 2.** Frequency of detection of virulence genes in *Campylobacter strains* spp.

Genes and factors virulence	<i>C. jejuni</i> (n = 32)		<i>C. coli</i> (n = 16)		p	Total (n = 48)	
	n	%	n	%		n	%
<b>Mobility</b>							
<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
<b>Adhesion</b>							
<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
<b>Chemotaxis</b>							
<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
<b>Infestation</b>							
<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
<b>Toxins</b>							
<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
<b>Capsule</b>							
<i>kpsM</i>	29	90,63	13	81,25	0,05	42	87,50
<b>Siderophores</b>							
<i>cfrA</i>	27	84,38	11	68,75	0,05	38	79,17
Fur	30	93,75	14	87,50	0,05	44	91,67

Multivariate analysis, this genotype increases the likelihood of severe campylobacteriosis by 12.57 [3.159; 50.019] times ( $p < 0.001$ ).

### Sequence types *Campylobacters* and their geographical distribution

Phylogenetic analysis showed that some strains classified as *C. jejuni* formed a separate genetically distinct group. In 8 strains, some alleles belonging to the *C. jejuni* taxonomic cluster were also found in *C. coli* and vice versa, caused by the genetic mosaic occurring within the genus.

A comparison of the diversity of constitutional genes in *C. coli* and *C. jejuni* was performed. Among 32 *C. jejuni* strains, multilocus sequencing typing (MLST) revealed 18 different MLST sequence types, which were sorted into 12 different complexes. The geographical distribution of the identified genotypes in other regions of the world is presented in **Table 3**.

When matching sequence types of *Campylobacters* isolated from patients with data from international databases, the similar sequence types were shown to be most common in North America (USA and Canada), Northern Europe (Great Britain, Holland) and Scandinavia (Denmark, Sweden, Finland). Among 16 *C. coli* strains, 10 different types of MLST sequences were detected. Various types of sequences are maximally represented in Great Britain, Holland and Luxembourg. The nature of the geographical distribution of isolated *C. jejuni* and *C. coli* in patients in the study had a number of similarities, in particular, the dominance of sequence types, most common in Northern Europe, was noted. Close socio-economic ties and geographic proximity of the countries represented create the prerequisites for the multiple routes of the pathogen transmission, which probably explains such a distribution.

## Discussion

Contradictions and lack of consistency in data on the forms of the disease and severity are associated with the pathogenic potential of the pathogen and differences in the immune response. Previous studies have demonstrated the high conservation of flagellar genes, which are critical virulence factors [19, 20] ensuring the colonization and survival of campylobacteria [21]. Flagella are necessary to resist intestinal motility, which might otherwise displace the microorganism from the gastrointestinal tract [22]. The flagellar filament consists of the protein flagellin, which is encoded by two adjacent genes: *flaA* and *flaB*. In the works of L. Koolman et al. *flaB*-negative campylobacters have been shown to exhibit partial motility and can remain viable [23]. However, in a number of other studies there was evidence that the absence of *flaB* reduced the colonization ability and virulence of the pathogen [24]. It is also worth noting that the absence of *flaB* was significantly more often detected in *C. jejuni* isolates compared to *C. coli*.

Genes *flaA* and *flaB* involved in the assembly of flagella, according to L. Koolman et al., are critical for invasion [25]. Not a single strain that lacked both genes simultaneously was isolated in this study, which partially confirms this hypothesis.

When analyzing the frequency of detection of virulence genes, attention was drawn to the rare detection of the *virB11* and *wlaN* genes. The *virB11* gene encodes proteins responsible for adhesion to enterocytes [25]. According to D. Bacon et al., identification of the *virB11* gene led to a sharp increase in the ability of adhesion compared to wild-type strains [26]. Similarly, the *wlaN* gene that encodes a b-1,3-galactosyltransferase involved in cell wall synthesis, greatly increases the ability of campylobacters to attach to the surface of the intestinal epithelium [27]. Apparently, the frequent detection of isolates that do not contain these genes indicates their auxiliary role, and their absence does not lead to a significant decrease in virulence.

Gene *wla* is considered in a number of publications as a key trigger of immunopathological reactions, in particular, triggering the development of autoimmune polyradiculopathies [28]. Its low prevalence in the study group may partly explain the lack of a large number of reports of confirmed cases of Guillain-Barré syndrome in children after campylobacteriosis in Russia.

The catalase gene *katA* was detected in 78% of isolates. This gene helps protect *Campylobacter* spp. against oxidative stress, increases survival within macrophages. At the same time, the presence of this gene leads to increased resistance to antibacterial drugs [29]. Iron uptake genes (*cfrA* and *fur*) were also present in the majority of isolates (79.17 and 91.67%, respectively).

In the group with severe campylobacteriosis, the IgA level was statistically significantly lower than in moderate campylobacteriosis ( $p = 0.239$ ). It cannot be excluded that IgA deficiency negatively affects the course of the disease due to insufficient neutralization of pathogen toxins. An increase in the level of IgG, which makes up 75–80% of antibodies in plasma, providing long-term humoral protection against re-infection, was observed only in patients with severe campylobacteriosis ( $p = 0.039$ ). Obviously, in these patients, the elimination of *Campylobacter* from the body was delayed, which led to a longer and more massive stimulation of the immune response by pathogen antigens. Another predictor of severe campylobacteriosis was an increase in the level of IL-8. IL-8 is considered as a key trigger of nonspecific immune defense, being a chemoattractant affecting mainly neutrophils and monocytes [14]. An assessment of the dynamics of IL-8 levels also demonstrated undoubted prognostic significance. Long-term persistence of an increase in this marker acted as an unfavorable prognostic factor and was often observed during a protracted course of the disease. It was noteworthy that the pathogen genotype *flgE*<sup>+</sup>,

**Table 3.** Distribution of sequence types and core -genomic sequence types *C. jejuni* in various countries (n = 32)

Strain number	Sequence type	Denmark	UK	Holland	Australia	USA	Canada	Spain	Norway	Luxembourg	Japan	Uruguay	China	Belgium	France	Finland	Sweden	Czech Republic
Ei0796	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ei0797	137	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Ei0798	38	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Ei0800	48	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Ei0801	3503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ei0802	49	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Ei0803	52	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ei0804	2100	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Ei0805	61	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Ei0806	122	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Ei0807	206	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ei0808	353	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Ei0809	524	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ei0810	354	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Ei0811	443	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Ei0812	584	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ei0813	824	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ei0814	305	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

**Note.** «+» — presence; «-» — absence of *C. jejuni* in a given country.

*cdtA*<sup>+</sup>, *cdtC*<sup>+</sup> was more often detected in severe campylobacteriosis in the presence of significant deviations in the parameters of the immune response, which may be an additional prerequisite for the severe course of the disease. Analysis of the immunological parameters of the course of campylobacteriosis with the causative agent genotype *flgE*<sup>+</sup>, *cdtA*<sup>+</sup>, *cdtC*<sup>+</sup> revealed statistically significant differences in the level of IL-8 (0.013) and IgA ( $p = 0.021$ ) on the 1<sup>st</sup> day of the disease compared to patients, in which other genotypes of pathogens were detected.

### Conclusion

Thus, 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). Children with *C. coli* and *C. jejuni* infections with genotype *flgE*<sup>+</sup>, *cdtA*<sup>+</sup>, *cdtC*<sup>+</sup>, had a number of clinical differences during the infectious process from patients with other genotypes of the pathogen. Identification of *Campylobacter* spp. with the genotype *flgE*<sup>+</sup>, *cdtA*<sup>+</sup>, *cdtC*<sup>+</sup> on the 1<sup>st</sup> day of the disease is accompanied by a more frequent increase in the level of IL-8 and a decrease in the content of IgA in the peripheral blood serum, which may indicate insufficient efficiency of the immune response when infected with campylobacters of this genotype. It cannot be excluded that the identified features of the immune response during infection with campylobacters with genotypes *flgE*<sup>+</sup>, *cdtA*<sup>+</sup>, *cdtC*<sup>+</sup> underlie the long-term persistence of disease symptoms and an increase in the severity of the disease. Considering the high social and clinical significance of campylobacteriosis, it is advisable to further study the genotypic composition of circulating pathogens to assess the risk of developing severe forms of the disease and the formation of its long-term complications.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Nameed 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>
2. 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>
3. 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>
4. Климова О., Гончар Н., Раздьяконова И., Лобзин Ю. Этиологические и эпидемиологические особенности инфекционных гемокोलитов 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>
5. 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>
6. 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>
7. 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](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/ruwekw>

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/iadjkj>
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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *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>

**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](mailto: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-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

**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](mailto: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>

*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



# 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. Sominina<sup>1</sup>✉, Darya M. Danilenko<sup>1</sup>, Andrey B. Komissarov<sup>1</sup>, Maria M. Pisareva<sup>1</sup>, Tamila D. Musaeva<sup>1</sup>, Kirill A. Stolyarov<sup>1</sup>, Olga I. Afanasyeva<sup>1</sup>, Veronika S. Timonina<sup>2</sup>, Evgeny V. Venev<sup>1</sup>, Tatiana P. Levanyuk<sup>1</sup>, Elizaveta A. Smorodintseva<sup>1</sup>, Olga G. Kurskaya<sup>3</sup>, Alexander M. Shestopalov<sup>3</sup>, Evgenya V. Lelenkova<sup>4</sup>, Alexander V. Semenov<sup>4</sup>, Dmitry A. Lioznov<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>St. Olga Children's City Hospital, St. Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia;

<sup>4</sup>Federal Research Institute of Viral Infections "Virome", Ekaterinburg, Russia;

<sup>5</sup>First 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 2 5.11.2020; 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>

Оригинальное исследование

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

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

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

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Детская городская больница Святой Ольги, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия;

<sup>4</sup>Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром», Екатеринбург, Россия;

<sup>5</sup>Первый 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 клинико-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 клинко-эпидемиологического анализа, молекулярной диагностики и генетической характеристики возбудителей (2021–2023) Рег. № НИОКТР 121051900143-7 при поддержке со стороны Фонда по эпидемиологии Франции («Fondation pour 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., Лизнов 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>

## Introduction

Although progress has been made in influenza and acute respiratory disease surveillance and preparedness for the upcoming influenza pandemic through improved methods for specific detection and monitoring of acute respiratory viral infections (ARVI), vaccination of target populations, development and validation of platform technologies for rapid vaccine release, expansion of vaccine production capacity, and improved collaboration among countries in the World Health Organization (WHO) system with the development of the Global influenza strategy<sup>1</sup>, many problems and unresolved issues remain in this area, specifically in the area of epidemiology and prevention. The existing system of traditional surveillance of influenza and acute respiratory infections has only statistical information on the total number of diseases and hospitalizations with these infections, as well as deciphering their etiology in general among the surveyed groups, but does not provide information on the clinical features and severity of diseases depending on their etiology, age of patients and other individual characteristics. At the same time, in recent years, new data on the role of co-morbidities in influenza, as well as the long-term consequences of severe acute respiratory infections (SARI) of different etiologies (heart attacks, strokes, exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease, diabetes, etc.) have been emerging [1–3]. This determines the need for further improvement of surveillance of influenza and other acute respiratory infections.

The importance of personalized clinical and epidemiological surveillance became evident during the

development of the latest influenza pandemic caused by the emergence of a new reassortant with the antigenic formula A(H1N1)pdm09 in 2009. To this end, in Russia, starting in 2010, a pilot project began to investigate the possibilities of Signal (sentinel) surveillance of SARI and influenza-like illnesses and acute respiratory infections [4], and since 2012 — in-depth Hospital Surveillance (HS) for influenza and other acute respiratory infections as part of the Global Influenza Hospital Surveillance Network [5–9]. This system, currently used for scientific purposes in more than 20 countries in the Northern and Southern Hemispheres, makes it possible to study the etiology of severe influenza, identify risk groups in need of priority protection, determine the age-specific etiology of SARI with the identification of dominant pathogens, dangerous combinations with comorbidities leading to hospitalization, and assess the severity of the epidemic/pandemic.

In the HS system, for each patient included in the study, an anonymized card is filled in, containing the hospital code, patient number, information on gender, age, chronic diseases, influenza and COVID-19 vaccination status, bad habits, previous hospitalizations, as well as criteria for the severity of the course of infection (need for oxygen support, hyperthermia, transfer to the intensive care unit (ICU), etc.), disease outcome and laboratory diagnosis data. It should be noted that all participants of the system use unified standardized case definitions and patient records, which allows comparing the features of SARI according to uniform criteria in different countries of the world. The main feature is diagnosis using polymerase chain reaction (PCR) for respiratory infectious agent viruses of all patients included in the study, and sequencing and antigenic analysis for a number of samples from patients. Analysis of the antigenic and genetic structure of influenza viruses

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

can determine whether viruses circulating in a particular season match the strains included in the vaccine.

The spread of the COVID-19 pandemic has led to a marked shift in the pattern of circulating influenza and acute respiratory viruses among hospitalized patients of different age groups with SARI. Therefore, the aim of the study was 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

### *Study design*

Clinical and laboratory monitoring of influenza, COVID-19 and other acute respiratory viral infections among hospitalized patients in the HS was conducted in 9 hospitals in St. Petersburg, Novosibirsk and Yekaterinburg in accordance with the Standard Protocols for Children Under 5 Years of Age and for Patients 5 Years of Age and Older used in the HS. In addition to the basic parameters (sex, age, hospitalization period, etiology according to PCR data, vaccination history, diagnosis at admission and discharge, concomitant pathology, smoking, disease outcome, etc.), physicians assessed the severity of the disease. The study was conducted according to the principles of Good Clinical Practice after approval by the Local Ethics Committees. Throughout all 5 seasons (from 2018–2019 to 2022–2023), the screening survey started from week 40 and the main HS surveys started on the week when the first 3 laboratory-confirmed cases of influenza were detected by PCR in the city hospitals. Surveys were completed at the end of the influenza epidemic season, usually in week 18–20, when no more cases of SARI with laboratory-confirmed influenza were identified in the wards of all hospitals included in the study. The duration of the study averaged 6–7 months. The results of the examination of patients were submitted by physicians into Individual patient charts and sent via the Internet to the Electronic Database at the A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, where they (after control of completeness and accuracy of filling) were stored throughout the period of work with the possibility of automated output of the requested data.

To be included in the study, patients had to have a combination of the following symptoms: 1 or more of 4 systemic symptoms: fever, weakness, headache, myalgia, and 1 or more of 3 respiratory symptoms: cough, sore throat, rapid breathing. The duration of the disease at the time of inclusion in the study should have been no more than 7 days from the onset of registration of symptoms, the duration of hospitalization — no more than 48 h. 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 De-

ember 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).

Criteria for exclusion from the study: the patient is not a resident of the city, duration of illness more than 7 days, duration of hospitalization less than 24 hours, patient's belonging to a specialized medical or social institution, lack of patient's consent to participate in the study, inability to communicate with the patient.

### *Collection and statistical analysis of data*

Data collection, their subsequent correction, systematization of initial information and analysis of the obtained results were carried out by specialists of the A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza using the Individual patient records entered by physicians in the Electronic Database of HS.

Statistical processing of the results was carried out using the Statistica v. 10 program: descriptive statistics, nonparametric criteria. When assessing quantitative indicators, the median was counted as the center of distribution, and the first ( $Q_1$ ) and third ( $Q_3$ ) quartiles were counted as variation indicators. The results of qualitative traits were expressed in absolute numbers with indicating percentages. Comparison of nominal data between groups was performed using Pearson's  $\chi^2$  test. When the number of expected observations in any cell of the quadratic table was less than 10, Fisher's exact test was used to assess the significance level of differences. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

### *PCR diagnostics*

For laboratory diagnosis, nasopharyngeal and oropharyngeal swabs were taken from each patient aged  $\geq 14$  years, and nasal and pharyngeal swabs were taken from children younger than 14 years. Laboratory testing for influenza viruses and other ARI pathogens was performed by PCR within the first 48 h of hospitalization. For clinical specimens, velour swabs (Copan) were used, which were immersed in universal transport medium UTM-330C (Copan) for mycoplasmas, chlamydia and viruses. RNA was isolated from clinical samples using AmpliSens RIBO-prep (InterLabService) or QIAGEN RNeasy Mini (Qiagen) kits. RNA reverse transcription was performed with the Reverta-L kit (InterLabService) or QIAGEN OneStep RT-PCR (Qiagen). AmpliSens Influenza virus A/B-FL kits (InterLabService) were used to test for influenza A and B; influenza A-positive samples were used to subtype influenza viruses A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) using AmpliSense Influenza virus A/H1-swine-FL kits (InterLabService) and AmpliSens Influenza A subtyping-FL kit (InterLabService). All samples were also tested for the presence of other ARVI pathogens (human respiratory syncytial virus, metapneumovirus, parainfluenza

virus types 1–4, coronavirus, rhinovirus, adenoviruses, bocavirus) and examined using the AmpliSens ARVI-screen-FL kit (InterLabService). Specific sequences of influenza B virus of the Yamagata or Victoria lineages were determined in all influenza B-positive samples using the QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) with WHO-recommended primers and probes. Real-time PCR was performed on a Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) or the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

## Results

### Age distribution of patients

Over a 5-year period, starting from the 2018–2019 season, 18,458 patients hospitalized in ARVI wards with primary diagnoses of influenza, acute respiratory viral infection, pneumonia, acute bronchitis, and other manifestations of acute respiratory infections of varying severity were examined in 3 infectious diseases hospitals for adults and 6 multidisciplinary hospitals for children in St. Petersburg, Novosibirsk and Yekaterinburg. Analysis of the age distribution of the hospitalized (on average) showed a significant proportion of chil-

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

Age, years	Number of patients	Median age, years (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> )
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)
Total	18458	4,75 (1,5; 21,7)

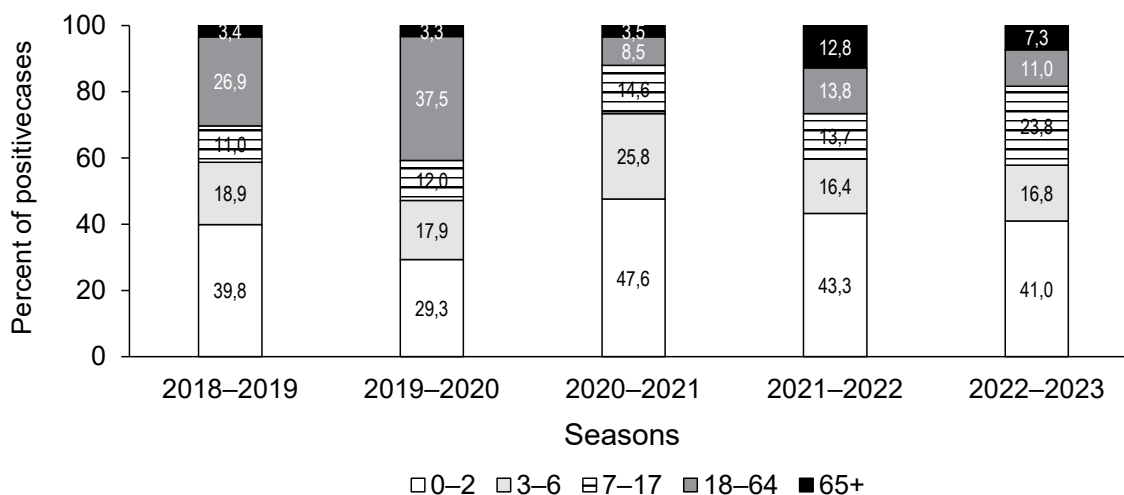
**Note.** \*For children of group 0–2 years, age indicated in months.

dren (73.8%), including those aged ≤ 2 years (39.7%), 3–6 years (18.5%), 7–14 years (15.6%). The frequency of hospitalization of patients aged 15–64 years averaged 19.7% for the whole period, including patients aged 65 years and older — 6.5% (**Table 1**).

The frequency of hospitalization of children of the 0–2 years age group was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than patients of all other age groups in general during the study period, and also significantly higher in 2018–2019 and 2020–2023. In the period from October 2019 to September 2020, when the first wave of the pandemic developed in Russia, the age distribution of patients hospitalized in wards with acute respiratory infections changed: the frequency of hospitalization in the group 15–64 years increased to 37% against the background of a decrease in hospitalization of children aged ≤ 2 years to 29.3% ( $p < 0.001$ ). In 2021–2022, there was an increase in the frequency of hospitalization of patients aged 65 years and older compared with the frequency of hospitalization in other years ( $p < 0.000$ ; **Figure 1**).

### Etiology of ARVI

The viral etiology of diseases was deciphered in 58.3% of cases on average over the entire period (57.8–59.1%;  $p = 0.95$ ). In our observations, the frequency of cumulative detection of non-influenza acute respiratory infections during the entire period and in the last 3 seasons was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than cases of laboratory-confirmed influenza and SARS-CoV-2. Interestingly, the ratio of patients hospitalized with laboratory-confirmed influenza and other acute respiratory infections was similar before the pandemic in 2018–2019 and 2019–2020 (0.95 and 1.2, respectively;  $p = 0.275$ ), but changed dramatically in the following 3 years due to the spread of SARS-CoV-2. Thus, in 2020–2021, influenza virus was practically eliminated from circulation and was detected in the HS system in only 0.1% of cases, although other SARI pathogens



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

(excluding RSV) were detected with the same, or even higher frequency (89.0%).

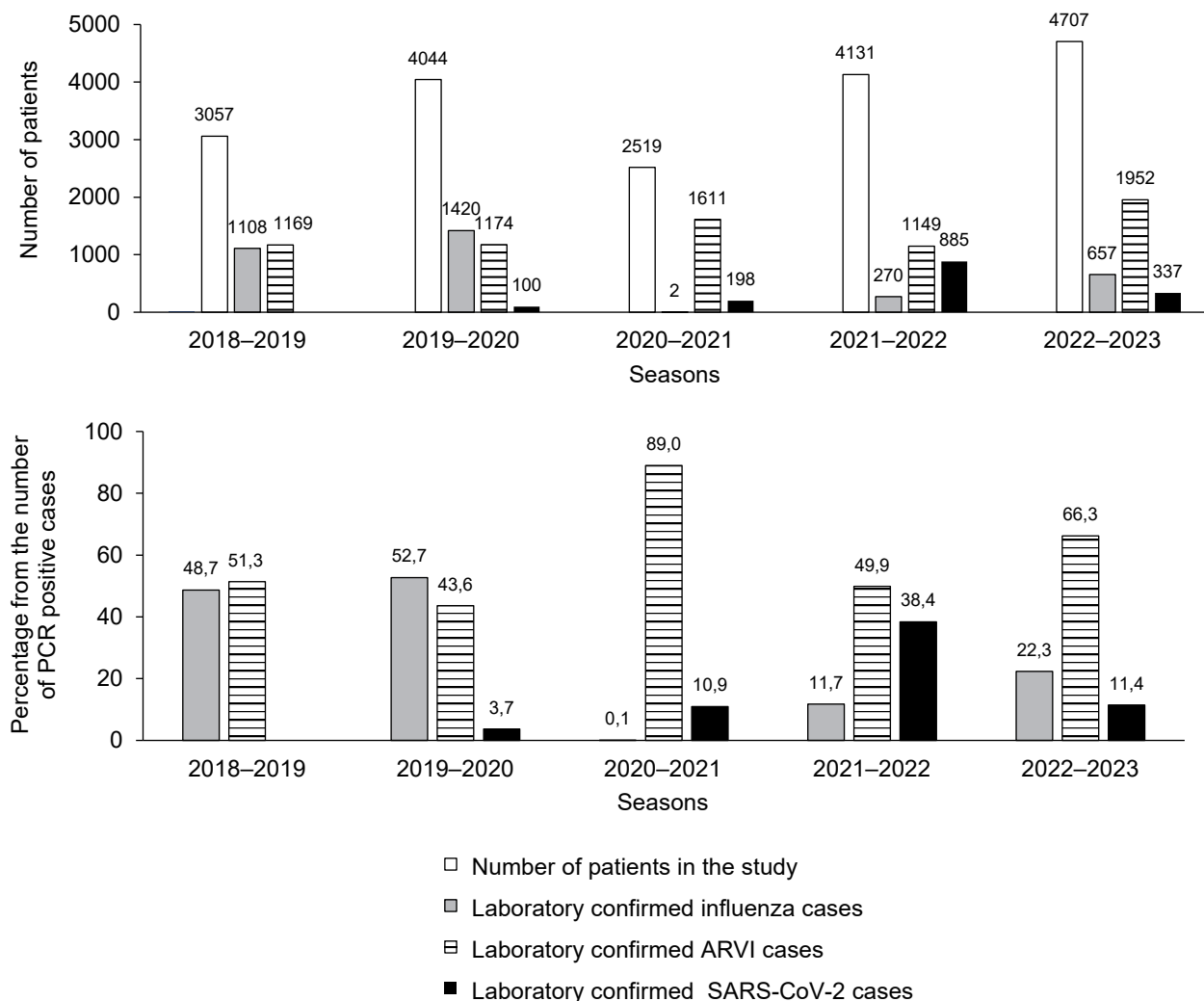
In the post-pandemic period, the detection rate of influenza viruses among hospitalized persons began to increase (to 11.7–22.3%), but never reached the pre-pandemic level and remained significantly lower ( $p < 0.001$ ) compared to ARVI (4.3 and 2.9 times in the 2021–2022 and 2022–2023 seasons). The frequency of SARS-CoV-2 detection peaked (38.4%) in the 2021–2022 season with a decrease to 11.4% in the latter season (Figure 2).

#### Analysis of diseases caused by different types/subtypes of influenza virus

In the 2018–2019 and 2019–2020 seasons, influenza A(H1N1)pdm09 virus was the main etiologic agent, causing 53.2% and 44.0% of influenza illnesses, respectively, and co-circulating with influenza A(H3N2) virus (45.1%) in 2018–2019 and with influenza B Victoria virus (48.6%) in 2019–2020. Few cases of Yamagata influenza B lineage were reported at

the end of the 2018–2019 (9 cases) and 2019–2020 (2 cases) seasons, while the remaining influenza B cases were detected only with Victoria lineage viruses. In the 2020–2021 season, with the start of the active phase of the COVID-19 pandemic in Russia, no influenza cases were registered among hospitalized patients, except for 2 cases in Yekaterinburg, when trace amounts of influenza B virus RNA were detected in patients, which did not allow its subtyping to be performed.

The 2021–2022 season was characterized by an unusually early onset of influenza A(H3N2) virus circulation: the first influenza cases among hospitalized patients were detected as early as week 41 of 2021, and the number of influenza cases peaked in week 48. The epidemic was mono-etiologic (97.0%) and was caused by influenza A(H3N2) virus. Only at the end of the season, sporadic cases of influenza B were detected. Against the background of the increased number of hospitalizations with COVID-19, the total number of influenza cases among hospitalized patients became significantly lower ( $p < 0.001$ ) by 4.0 and 5.5 times



**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.

compared to the 2018–2019 and 2019–2020 seasons, respectively. The last influenza epidemic season was characterized by a cardinal change of the pathogen with the return of influenza virus subtype A(H1N1)pdm09 and influenza B viruses of the Victoria lineage (Table 2, Fig. 3).

Thus, a feature of the last 2 epidemics was an earlier onset of influenza virus circulation (by 6–9 weeks compared with the epidemics of the pre-pandemic period) with peak PCR detection of viruses in hospitalized patients as early as the 48<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> weeks of the year (compared with 5–7 weeks of the following year in the pre-pandemic seasons) (Fig. 3).

#### Monitoring the etiology of non-influenza acute respiratory diseases

A study of the structure of respiratory morbidity of non-influenza etiology, whose incidence among hospitalized patients was significantly higher than that of influenza (38.2% vs. 21.7% of the number of patients examined;  $p < 0.0001$ ), showed that in the pre-pandemic period the most significant ( $p < 0.0001$ ) pathogen was RSV, which caused the greatest number of hospitalizations (up to 26.8% in children aged  $\leq 2$  years). Rhinoviruses were the next most important (up to 16.6% in this age group). The role of the other pathogens was generally relatively minor.

The emerging COVID-19 pandemic has fundamentally changed the etiologic picture: in the 2020–2021 season, RSV (as well as influenza viruses) practically disappeared from circulation, and only isolated cases of this infection were registered among hospitalized patients. Of particular interest is the sharply increased (6–12 times) importance of metapneumovirus infection ( $p < 0.000$ ), the pathogen of which belongs to the same family as RSV (Pneumoviridae). In the next season (2021–2022), there were practically no cases of metapneumovirus infection, but RSV reappeared in the circulation, which became even more active in the 2022–2023 season, reaching the indicators characteristic of the pre-pandemic period (Fig. 4).

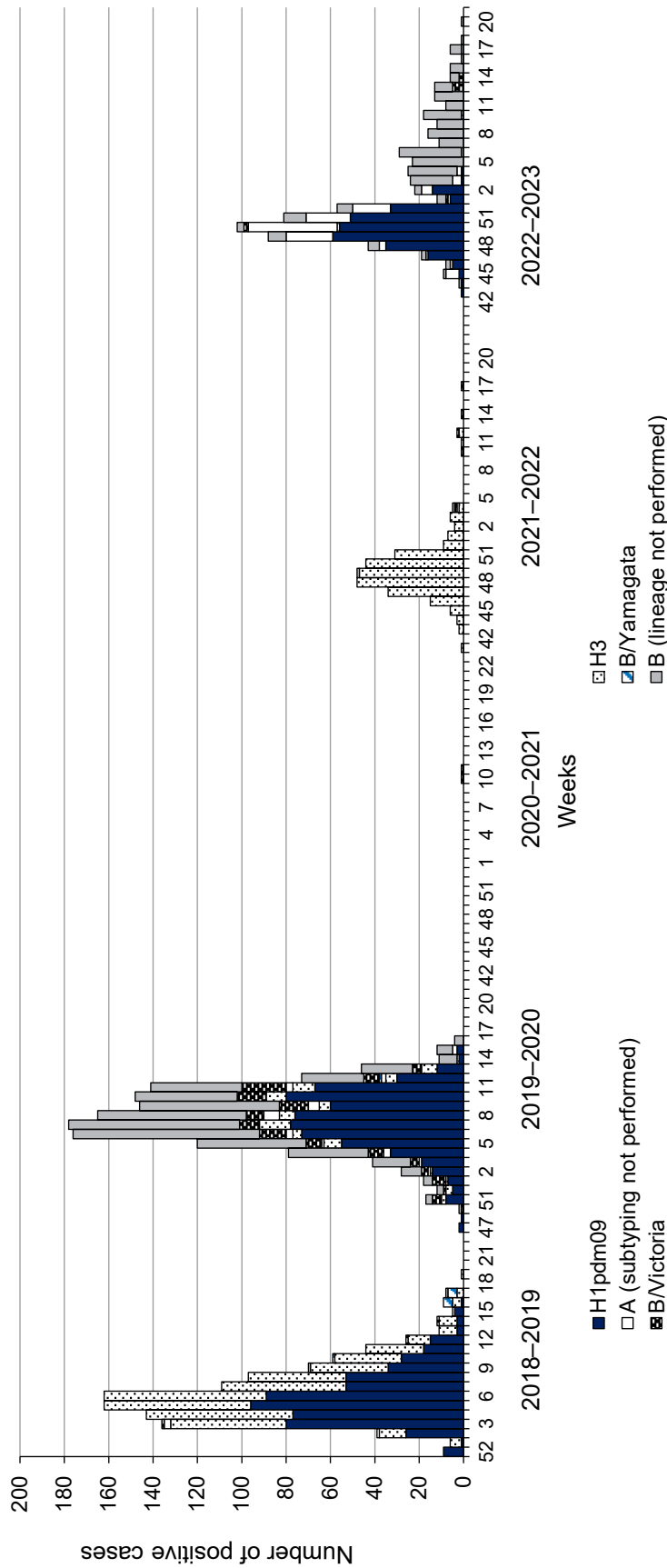
#### Age-specific etiologies of the most important respiratory infections

Analysis of the total annual data on the role of the main pathogens in the hospitalization of patients depending on age showed that in all these years, except for two seasons of active spread of SARS-CoV-2, RSV affected predominantly children of younger age groups 0–2 and 3–6 years (up to 16.5–26.8% of patients), but was rarely registered in age groups 7 years and older ( $p < 0.0001$ ). The age range for rhinovirus infection was significantly wider, covering all pediatric age groups. The frequency of rhinovirus detection in hospitalized children in the 0–2 year age group ranged from 10.1 to 16.6% and was significantly higher than in adult patients aged 18–64 and  $\geq 65$  years in all years ( $p < 0.001$ ). Differences between rhinovirus detection rates in hospitalized children aged 0–2 and 3–6 years were not significant. Interestingly, in the 2020–2021 season, when RSV circulation decreased dramatically, there was a significant increase in the frequency of rhinovirus detection compared to the previous two seasons ( $p < 0.001$ ). In the last season compared to 2021–2022, there was a trend of increasing frequency of RSV ( $p < 0.001$ ) and rhinovirus infection ( $p < 0.001$ ) against the background of decreasing significance of COVID-19 ( $p < 0.001$ ).

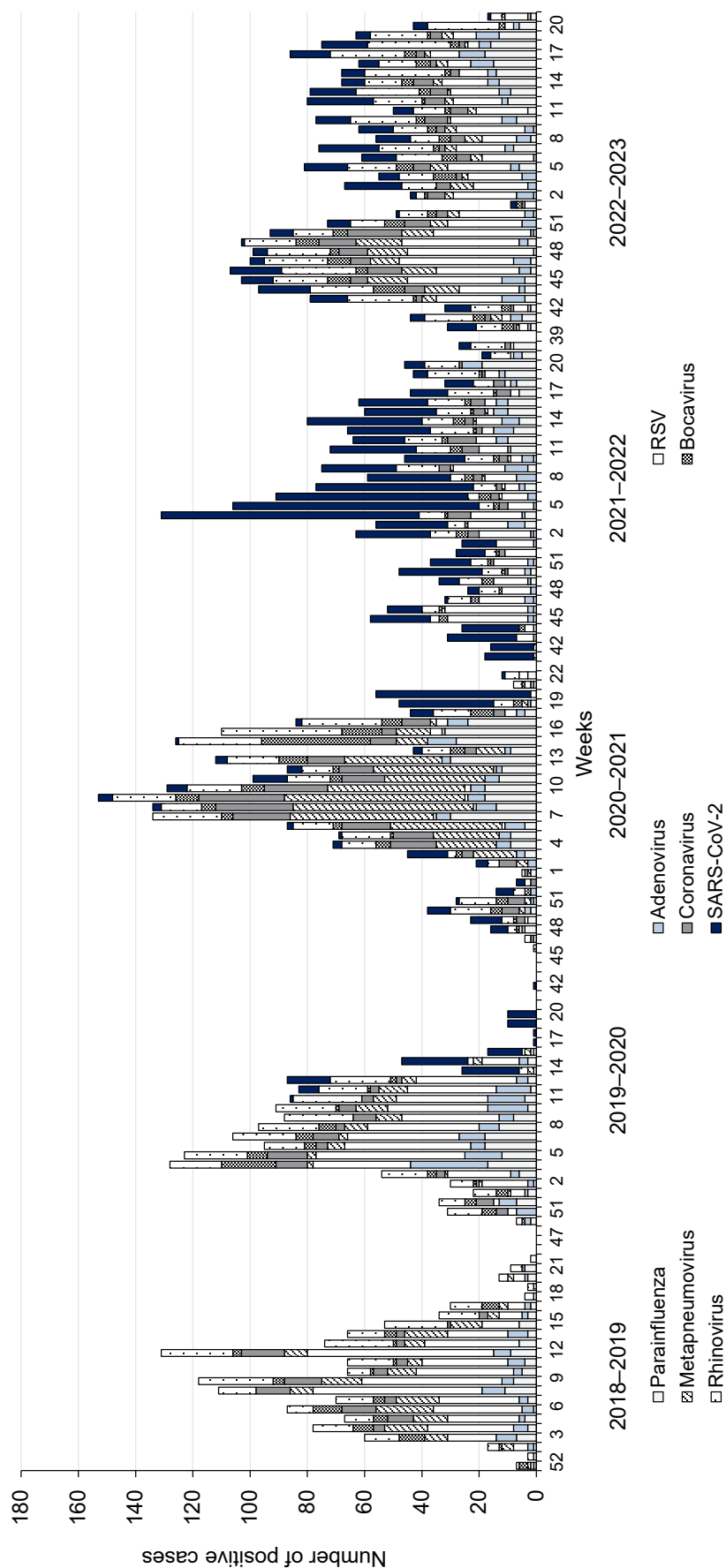
In contrast to RSV and rhinovirus infection, COVID-19 as a cause of hospitalization was reported significantly less frequently in children than in adults ( $p < 0.001$ ). At the beginning of the pandemic (2019–2020 season), no COVID-19 cases were reported among hospitalized children under 17 years of age; in the following season, the detection rate of the virus in children across age groups was also low, ranging from 0.8% to 2.4% of those examined in this age group (with a detection rate of 52.1–66.7% in adults). In the 2021–2022 season, the detection rate of SARS-CoV-2 among hospitalized children increased to 6.8–13.6%. These differences became less pronounced in the latter season due to a decrease in SARS-CoV-2 detection among both children and adults. The detection rate of SARS-

**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

Season	Number of patients	Influenza cases		Percentage of PCR-positive influenza cases by type/subtype			
		number	%	A(H1N1)pdm09	A(H3N2)	A not subtyped	B
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
Total	18458	3457	18,7	43,3	24,3	4,5	27,9



**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.



**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.



CoV-2 in adult patients aged 18–64 and  $\geq 65$  years was significantly higher compared with other age groups in all seasons ( $p < 0.001$ ), but the differences between the detection rates of SARS-CoV-2 in the 18–64 and  $\geq 65$  age groups were only significant in the 2022–2023 season, when the percentage of hospitalizations among adults aged 18–64 years decreased 3.5-fold ( $p < 0.001$ ; **Figure 5**).

#### *Etiology of respiratory disease in intensive care units*

During the entire period, 1112 (6.0%) of the total 18,458 hospitalized patients included in the study were referred to the ICU. Influenza viruses, SARS-CoV-2 or other ARI pathogens were detected in 668 patients. Children under 6 years of age were most frequently hospitalized in ICU in 517 (77.4%) cases during the whole period, children aged 7–17 years in 86 (12.9%) cases, and adults were the least frequently hospitalized in ICU in 65 cases (9.7% of the total number of patients in ICU (the differences are significant,  $p < 0.001$ ).

In young children (0–6 years of age), RSV infection was most frequently diagnosed in all seasons except 2020–2021, when SARS-CoV-2 spread widely (28.9–47.7% of all PCR-positive cases in the ICU). In the 2020–2021 season, the RSV detection rate dropped to 3.6% against the background of a

2–5-fold increased role compared with previous years of metapneumovirus infection (up to 28.4%), seasonal coronavirus infection (up to 14.2%), bocaviruses (up to 11.2%), and rhinoviruses (up to 20.9%) ( $p < 0.001$ ). In the next 2 seasons, the incidence of RSV and rhinoviruses increased to 28.9–41.7% and 45.4–18.7%, respectively, while COVID-19 was diagnosed in only 0.5–7.2% of cases in this group. The role of influenza viruses varied by season: during the pre-pandemic period, influenza A(H1N1)pdm09 virus was more frequently reported in children aged  $\leq 6$  years (11.9–16.4% of cases), influenza A(H3N2) virus was detected in 0.9–7.3%, and influenza B virus in up to 9.2% of cases. In the 2020–2021 season, diseases of influenza etiology among children were not registered in ICU, and their detection rate in the postpandemic period in ICU did not exceed 4.1%.

In school-aged children 7–17 years of age, the leading causes of hospitalization in the ICU were influenza A(H1N1)pdm09 viruses, 66.7 and 25.0% in the 2018–2019 and 2022–2023 seasons, influenza A(H3N2) viruses, 12.5 and 30.0% in the 2019–2020 and 2021–2022 seasons, and influenza B viruses, 50.0 and 19.4% in the 2018–2019 and 2019–2020 seasons, while metapneumovirus (24.0%), seasonal coronavirus (14.0%), and rhinoviruses (30.2%) were most frequent-

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

Season	Age, years				
	0–2	3–6	7–17	18–64	65+
<b>RSV</b>					
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
<b>Rhinovirus</b>					
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
<b>SARS-CoV-2</b>					
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

ly detected in the 2020–2021 season. COVID-19 cases were most frequently (32.0%) detected in schoolchildren in the 2021–2022 season, with a decrease to 8.4% in the following season due to the increased role of influenza and RSV viruses.

A different picture was observed in adult patients. If in the pre-pandemic period, influenza B viruses were the main cause of hospitalization in SARI, then, starting from the season 2019–2020, SARS-CoV-2 virus became the main cause of hospitalization in ICU (60–100% of cases). The role of other pathogens in the development of SARI in adults was insignificant.

A comparative analysis of disease etiology in patients admitted on general acute respiratory (GAR) and ICU wards showed that young children had the highest incidence of RSV diagnoses in ICU in all seasons except pandemic season 2020–2021, exceeding diagnosis incidence in GAR by 8.1–13.2%. In the 2021–2022 season, an excess of rhinovirus infection diagnosis was observed in ICU compared to GAR. In children 7–17 years of age, during the seasons of active circulation of influenza A(H1N1)pdm09 virus (2018–2019 and 2022–2023), this pathogen was diagnosed more frequently in ICU compared to GAR. In adult patients, the main differences concerned SARS-CoV-2, the detection rate of which was distinctly higher in ICU than in GAR. Differences in other infections were insignificant (**Fig. 6**).

### Discussion

Over a 5-year period, all 18,458 patients hospitalized in infectious diseases hospitals in 3 major Russian cities (St. Petersburg, Novosibirsk, and Yekaterinburg)

were examined by PCR to determine the role of influenza viruses A(H1N1)pdm09, A(H3N2), Victoria and Yamagata B lineages, SARS-CoV-2, as well as other pathogens such as RSV, rhinoviruses, metapneumoviruses, coronaviruses, adenoviruses, parainfluenza viruses, bocaviruses, in the development of SARI requiring hospitalization, and to determine age-specific etiology of disease. Weekly monitoring of influenza cases among the examined patients showed an alternation of dominant pathogens: A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) in the 2018–2019 season, A(H1N1)pdm09 and B in the 2019–2020 season, A(H3N2) in the 2021–2022 season, A(H1N1)pdm09 and B in the 2022–2023 season. Among influenza B viruses, strains of the Victoria lineage predominated in all seasons. The last cases of influenza B lineage Yamagata in our study among hospitalized patients were reported at the end of 2019–2020 season. In 2020–2021 season (developed SARS-CoV-2 pandemic), there were almost no cases of influenza A and B among the hospitalized patients studied. In the 2022–2023 season, the data obtained on the monitoring of influenza etiology among hospitalized patients clearly correlated with the results of traditional surveillance in Russia [10], while in North America and Western Europe, influenza A(H3N2) viruses were most prevalent [11, 12]. Such differences determine the necessity to formulate its own strategy of strain selection for vaccines in Russia (taking into account WHO recommendations) in order to improve the effectiveness of vaccine prophylaxis, as it is carried out at the national level in other highly developed countries, for example, the National Immunization Advisory Committee Technical Working Group in China [13].

**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)	B	Para- influenza	Adeno- virus	RSV	Metapneumo- virus	Corona- virus	Boca- virus	Rhino- virus	SARS-CoV-2
<b>All patients</b>											
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
<b>ICU patients</b>											
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

**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

Season	A(H1N1) pdm09	A(H3N2)	B	Para-influenza	Adeno-virus	RSV	Metapneumo-virus	Corona-virus	Boca-virus	Rhino-virus	SARS-CoV-2
<b>All patients</b>											
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
<b>ICU patients</b>											
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

**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

Season	A(H1N1) pdm09	A(H3N2)	B	Para-influenza	Adeno-virus	RSV	Metapneumo-virus	Corona-virus	Boca-virus	Rhino-virus	SARS-CoV-2
<b>All patients</b>											
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
<b>ICU patients</b>											
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

Interesting data were obtained by monitoring the expanded etiologic infrastructure of respiratory infections. It is generally believed that the sharp decline in the activity of influenza and RSV viruses in the early years of the pandemic caused by SARS-CoV-2 was due to the wide implementation of anti-epidemic measures [14]. Without denying this, it should be noted that according to our more extensive studies, against the background of suppression of these infections in the season 2020-2021, the role of such pathogens as seasonal coronaviruses, parainfluenza viruses and, especially, metapneumoviruses in the development of SARI increased

significantly, despite the anti-epidemic measures. In the following seasons, the frequency of RSV and influenza virus detections began to recover, and the importance of metapneumovirus infection in the hospitalization of patients decreased to the usually reported rates. These data support the earlier assumption that there is interference between individual pathogen species at the population level [15], which was previously observed only during the development of influenza pandemics. Thus, it is known that the subtype of seasonal influenza A(H1N1) in 2009–2010 was completely displaced by the newly emerged reassortant of human, swine and

avian influenza viruses — variant A(H1N1)pdm09, in 1957–1958 the A(H1N1) subtype was displaced by the "Asian" influenza A(H2N2) virus, and in the 1968–1969 season, the A(H2N2) influenza virus subtype was completely displaced by the newly emerged pandemic A(H3N2) strain of the "Hong Kong influenza" virus. The mechanisms of this phenomenon need to be further investigated. Obviously, the results of the HS significantly complement the data of the existing traditional surveillance system, allowing to analyze the etiology of SARI requiring hospitalization, which is not only of theoretical interest, but also important for practically significant calculations of socio-economic damage from costly hospitalization of patients. It is known that the system of traditional surveillance allows determining the start/end of the epidemic on the basis of comparison of the actual level of morbidity with threshold values (base lines) calculated from archival materials of non-epidemic morbidity for the previous 5 seasons. Furthermore, these data allow estimating the intensity of the epidemic based on the average statistical data for the previous years [16–20]. At the same time, the WHO guidelines have recently set new tasks: they point out the need to define such indicators "as the severity of the disease". It is stated that "the severity of the disease depends on the host organism, such as the presence of concomitant medical conditions that predispose the individual to develop severe disease, history of preventive vaccination (e.g., influenza and pneumococcal disease), the age of the individual, and the availability of medical care". HS opens up new possibilities for defining these indicators, which will be reflected in the following publications.

### Summary

Peculiarities of etiology of severe acute respiratory infections in children and adults were determined with assessment of the impact of the COVID-19 pandemic on the etiologic infrastructure of diseases.

Weekly monitoring showed a change in the etiologic mosaic of SARI pathogens during the COVID-19 pandemic, with a sharp decrease in the detection rate of influenza and RSV viruses and its gradual recovery in the post-pandemic period.

Age-specific etiologic features of SARI in ICU have been established. Severe forms of diseases in children in ICU in the post-pandemic period were most often associated with respiratory syncytial infection, while in adults the main pathogen of SARI was SARS-CoV-2.

### Conclusion

HS data significantly complement epidemiologic information obtained in the traditional surveillance system, which determines the feasibility of its introduction into clinical and epidemiologic practice. Monitoring of infections showed a continuously changing etiologic


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.

### 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/yjcgzsz>
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/jjad303>
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. Adlhoch 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>

### 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](mailto: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>

**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>

### 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](mailto: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>

**Комиссаров Андрей Борисович** — зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, 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. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1499-9957>

**Мусаева Тамила Даировна** — м.н.с. лаб. молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, 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. Смородинцева, 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. Смородинцева, 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. Смородинцева, 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. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-6888-6848>

**Смородинцева Елизавета Александровна** — к.м.н., в.н.с. лаб. изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, 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>

*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

*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>

*Люзнов Дмитрий Анатольевич* — д.м.н., профессор, директор НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, 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. (ААС), Даниленко Д.М. (ДМД)*; существенный вклад в дизайн работы — *ААС*; сбор данных — *Афанасьева О.И., Тимонина В.С., Вeneв 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., Мусеева Т.Д., Курская О.Г.*; формирование Криобанка клинических образцов — *Комиссаров А.Б., Писарева М.М.*; анализ данных — *ААС, ДМД, Леванюк Т.П.*; интерпретация данных — *ААС, ДМД, Люзнов Д.А.*; статистическая обработка результатов — *Столяров К.А., Смородинцева Е.А.*; критическая оценка работы на предмет важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение версии для публикации — *Шестопалов А.М., Семенов А.В., Люзнов 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.

Статья поступила в редакцию 19.04.2024;  
принята к публикации 05.06.2024;  
опубликована 29.06.2024

Original Study Article

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

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

Anna A. Vyazovaya<sup>1</sup>✉, Natalya S. Solovyova<sup>2</sup>, Alena A. Gerasimova<sup>1</sup>, Vyacheslav Yu. Zhuravlev<sup>2</sup>, Igor V. Mokrousov<sup>1</sup>✉

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

<sup>2</sup>St. 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., Solovyova 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>

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

Вязовая А.А.<sup>1✉</sup>, Соловьева Н.С.<sup>2</sup>, Герасимова А.А.<sup>1</sup>, Журавлев В.Ю.<sup>2</sup>, Мокроусов И.В.<sup>1✉</sup>

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

<sup>2</sup>Санкт-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) сполитипировали.

**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

**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>



## Introduction

The decline in tuberculosis (TB) incidence in Russia (from 57.7 per 100,000 of the population in 2015 to 31.1 in 2022) is accompanied by the continued spread of drug-resistant, primarily multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The share of multidrug resistance (MDR) among first-time diagnosed patients (primary MDR) increased from 27.5% in 2016 to 34% in 2022.<sup>1</sup>

The World Health Organization's (WHO) classic long-standing definition of MDR is that strains that are simultaneously resistant to two key first-line antibiotics: isoniazid and rifampicin. Treatment of MDR-TB requires the use of 2nd-line drugs, to which mycobacteria has also become resistant. In addition to MDR-TB, in 2006, WHO introduced the definition of broad (extensive resistance to fluoroquinolones and injectable antibiotics; XDR) and pre-broad (extensive resistance to either fluoroquinolones or injectable antibiotics; pre-XDR) drug resistance in 2006 [1]. The declining role of injectable antibiotics and the wider use of newer drugs has led to a modification of the definition of XDR and pre-XDR TB, which is recommended by WHO for use in clinical and surveillance purposes from January 2021. According to the new classification, TB caused by MDR strains of *M. tuberculosis* resistant to any of the fluoroquinolones was designated as pre-XDR-TB<sup>2</sup>. Pre-XDR strains with extensive resistance to bedaquiline or linezolid are defined as XDR-TB.

Thus, fluoroquinolones (previously ofloxacin, currently levofloxacin and the new generation fluoroquinolone moxifloxacin) have retained their importance in the treatment of MDR-TB. The development of resistance has implications for treatment outcomes: a study in Arkhangelsk in 2005-2008 showed that adverse outcomes were more likely among patients with acquired resistance to capreomycin (100% vs. 25.9%), ofloxacin (83.6% vs. 22.7%) or XDR (100% vs. 24.4%) [2].

The target of fluoroquinolones is the DNA-gyrase enzyme, which is necessary for replication and transcription of *M. tuberculosis* in the cell [3]. Resistance to fluoroquinolones in 90% of cases is associated with mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes encoding DNA-gyrase. Mutations in the hotspot of the *gyrA* gene (the region determining resistance to quinolones, codons 88-94) represent the main mechanism of resistance, while mutations in the *gyrB* gene are much less common and the role of several of them in resistance to fluoroquinolones is not always obvious [4, 5]. The most common mutations in *gyrA* are *Ala90Val*, *Asp94 (Gly,*

*Ala, His, Asn or Tyr)* and *Ser91Pro*, and the *Gly88Cys* mutation is less common [6–12].

Ofloxacin is currently not used for TB therapy, and a substantial proportion of strains phenotypically resistant to ofloxacin are sensitive to moxifloxacin. At the same time, the rapid development of drug resistance to ofloxacin and, as a result, a significant decrease in therapeutic efficacy led to a policy rejection of the use of this drug in the treatment of TB. In recent years, the WHO recommendations, as well as the Russian guidelines [13], have been significantly amended in terms of drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* by bacteriological methods — ofloxacin, cycloserine, para-aminosalicylic acid were excluded from the list of drugs to which testing is recommended.

At the same time, the molecular mechanism of resistance to all fluoroquinolones is mediated by mutations in DNA-gyrase genes, and the new WHO catalog of resistance mutations to antituberculosis drugs contains a list of proven resistance mutations in *gyrA* in relation to the new generation fluoroquinolone — moxifloxacin [14]. At the same time, a number of mutations are defined as leading to a high level of resistance to moxifloxacin: *gyrA Gly88Cys, Asp94Asn, Asp94Gly, Asp94His, Asp94Tyr*.

In northwest Russia, the first study of ofloxacin-resistant *M. tuberculosis* strains aimed at investigating the variability of the *gyrA* and *gyrB* genes was conducted in 2008 and was mainly based on strains isolated from previously treated TB patients (85.4%) [15]. Analysis of such a sample does not provide a reliable answer to the question regarding which strains are currently actively circulating; such an analysis requires a cohort of newly diagnosed patients.

*M. tuberculosis* is characterized by a clonal population structure consisting of large phylogenetic lineages, smaller genotypes and genetically compact clusters of closely related strains. Some genotypes or their subtypes are characterized by association with drug resistance, increased transmissibility or hypervirulence, which determines their clinical significance and the need for more careful monitoring of their spread. Russia is characterized by the dominance of the Beijing genotype in the general population, especially strong among resistant strains. An earlier study of ofloxacin-resistant strains in northwestern Russia showed that 73% of strains from previously treated patients and 71% of strains from newly diagnosed patients belonged to the Beijing genotype [16]. A mutation in the *gyrA* gene was found in 89% of Beijing strains and 69% of strains of other genotypes. This dominance of Beijing strains among those resistant to ofloxacin is significantly higher than the share of the Beijing genotype in northwestern Russia: 52–56% [16, 17] in the general population; 34% among sensitive strains in St. Petersburg [17]. The authors of the 2008 study concluded that, similar to the spread of MDR-TB, the

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases. URL: [https://nmrc.ru/for\\_specialists/main-directions/tuberculosis](https://nmrc.ru/for_specialists/main-directions/tuberculosis)

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

spread of fluoroquinolone-resistant TB in Russia may be due to the predominance of the Beijing genotype in the *M. tuberculosis* population [15].

In another study in northwestern Russia [18], the Beijing genotype was detected in 70.8% of isolates with a low level of ofloxacin resistance, 84.6% of isolates with a high level of resistance, and 50% of sensitive strains; the proportion of Beijing was significantly higher among strains highly resistant to ofloxacin compared to sensitive strains ( $p = 0.03$ ). However, it is possible that the association of Beijing with high levels of ofloxacin resistance is not so much a matter of Beijing dominance among MDR strains.

In 2006, in various regions of northwestern Russia, the proportion of *M. tuberculosis* strains resistant to ofloxacin ranged from 1.1–1.6% among newly diagnosed TB patients and 4.1–10.3% among previously treated patients [15]. Analysis of the drug susceptibility pattern of *M. tuberculosis* among newly diagnosed TB patients in northwest Russia for 2010–2021 showed a rapid (2.5-fold) increase in drug resistance to rifampicin in combination with fluoroquinolones (from 2.4%; 95% confidence interval (CI) 2.2–2.6 to 6.1%; 95% CI 5.6–6.6) [19].

Due to the spread of MDR-TB and the use of second-line drugs, it is important for clinical practice to test the sensitivity of the pathogen to fluoroquinolones other than isoniazid and rifampicin.

Given the increasing proportion of MDR strains of *M. tuberculosis* isolated from newly diagnosed patients in Russia, it was relevant to study the distribution of mutations in genes that cause resistance to fluoroquinolones in the modern period.

**The aim** of the present study was the molecular characterization of a retrospective collection of ofloxacin-resistant *M. tuberculosis* strains from newly diagnosed TB patients in northwestern Russia.

## Materials and methods

The study collection included 599 *M. tuberculosis* isolates from the working collection of the bacteriological laboratory of the St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, which was isolated in 2015–2019 from previously untreated TB patients living in various regions of northwest Russia.

Cultivation and determination of drug sensitivity of *M. tuberculosis* to the main antituberculosis drugs were performed using the standard indirect method of absolute concentrations on dense nutrient media and with the modified proportion method on liquid medium in a system with automated growth detection for antituberculosis drugs BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson). The critical drug concentrations used were 1.0 µg/mL for streptomycin, 0.1 µg/mL for isoniazid, 5.0 µg/mL for ethambutol, 1, 0 µg/mL for rifampicin, 100 µg/mL for pyrazinamide, 1.0 µg/mL for amikacin, 2.5 µg/mL for capreomycin, 2.0 µg/mL for ofloxacin,

and 5 µg/mL for ethionamide<sup>3</sup>.

DNA was isolated from pure cultures of *M. tuberculosis* as described previously [15]. To determine genotypic resistance to fluoroquinolones, multiplex PCR was used (Amplitub-MLU-RV and Amplitub-FQ-RV (Syntol) kits).

Belonging to the Beijing genotype and its subtypes B0/W148, Central Asian/Russian, CAO, Beijing 1071-32-cluster, 14717-15-cluster was determined by PCR and real-time PCR methods to identify specific markers [20]. Strains of other genetic groups (non-Beijing) were spoligotyped [21]. The obtained spoligotype profiles were compared with the SITVIT2 international database<sup>4</sup> and the SIT (Spoligotype International Type) number was determined.

Statistical analysis was performed using MedCalc<sup>5</sup>. Differences between groups were determined by the  $\chi^2$  criterion; differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

Drug sensitivity assessment of 599 *M. tuberculosis* strains isolated from newly diagnosed TB patients showed that 292 (48.7%) strains were sensitive to all 1<sup>st</sup>-line antituberculosis drugs (streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol), 230 (38.4%) isolates had MDR. Phenotypic resistance to ofloxacin was established in 6.7% (40/599) of strains in the general sample and in 17.4% (40/230) of MDR strains of *M. tuberculosis*. According to the new WHO definition, all 40 ofloxacin-resistant strains were pre-XDR (**Table 1**).

Genotyping showed that in the total collection of *M. tuberculosis* strains, the share of the Beijing genotype was 57.8% (346/599). The remaining 253 strains belonged to different genetic families of the Euro-American phylogenetic lineage of *M. tuberculosis* (another name is lineage 4), predominantly T (31.6%; 80/253), LAM (Latin American Mediterranean) (25.3%; 64), Ural (22.9%; 58), and Haarlem (9.9%; 25). The Central Asian/Russian (including the CAO subtype) and B0/W148 clusters of the Beijing genotype included 34.2% (205/599) and 17.4% (104) of strains, respectively.

Ofloxacin-resistant strains were predominantly (85%; 34/40) of the Beijing genotype. At the same time, 18 (45%) strains were assigned to the best known Russian epidemic subtype Beijing B0/W148-cluster, 12 (30%) to Beijing Central Asian/Russian. Of the latter, 2 strains represented the CAO subtype, which is more characteristic of Central Asia and quite rare in Russia [20, 22]. All Beijing strains had the SIT1 spoligotype, 1 strain belonged to the ancient sublin-

<sup>3</sup> Order of the Ministry of Health of Russia dated December 29, 2014 No. 951 “On approval of methodological recommendations to improve the diagnosis and treatment of respiratory tuberculosis.”

<sup>4</sup> SITVIT2. URL: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>

<sup>5</sup> MedCalc. URL: [http://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)

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

SIT, family	43-spoligoprofile	Number of strains	<i>gyrA</i> mutation
SIT1 Beijing	□□■	34	19 — <i>Asp94Gly</i> 8 — <i>Ala90Val</i> 3 — <i>Asp94Ala</i> 2 — <i>Ser91Pro</i> 1 — 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>

**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.

age (cluster 1071-32), and the others to the modern sublineage of the Beijing genotype. We also identified 4 strains of genotype LAM and 2 strains with spoligotypes SIT53 and SIT251, which belong to group T according to the SITVIT2 database. Taking into account the heterogeneity and polyphyletic nature of both the T group as a whole and the SIT53 spoligotype [23, 24], it is more appropriate to define these strains as L4-unclassified.

Mutations in the *gyrA* gene were detected in 97.5% (39/40) of *M. tuberculosis* strains (Table 2). The most frequent mutations were found in codon 94 (69.2%; 27/39); they were represented by 3 variants of single-nucleotide polymorphisms, among which the *Asp94Gly* substitution was detected in 57.5% (23/40) of ofloxacin-resistant strains and was dominant among both Beijing (19/34) and non-Beijing (4/6) strains. The second most frequent substitution was *Ala90Val* (25%, 10/40) which was established in 23.5% (8/34) of Beijing strains and 33.3% (2/6) of non-Beijing strains. Cumulatively, *M. tuberculosis* strains with *Asp94Gly* and *Ala90Val* mutations in the *gyrA* gene accounted for

82.5% (33/40). The simultaneous presence of 2 mutations in a single strain was not detected.

When analyzing the polymorphism of the *gyrA* gene, it should be taken into account that not all mutations, even in codons adjacent to hotspots, contribute to resistance. The most well-known phylogenetic substitution is a mutation in *gyrA95*, which was proposed as an evolutionary marker back in 1997 for the very first scheme of dividing *M. tuberculosis* species into major genetic groups [25]. Currently, as a modern source of information on the significance of resistance mutations (or lack thereof), one can refer to the WHO Mutation Catalog, the second edition of which was published in 2023. [14]. The enumeration of this codon *gyrA95* in the same row with mutations in the hotspot of the *gyrA* gene [7, 26] creates an erroneous impression of its correlation with resistance to fluoroquinolones.

Analysis of ofloxacin-resistant strains of different genotypes revealed all variants of the detected mutations in the *gyrA* gene in strains of the Beijing Central Asian/Russian subtype. More than a half of ofloxacin-resistant strains Beijing B0/W148 (10/18) and Cen-

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

<i>gyrA</i> mutation	All strains	Beijing, all	Beijing B0/W148	Beijing Central Asian/Russian*	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		
Not detected	1 (2,5%)	1	1			

**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.

tral Asian/Russian (7/12) had the *Asp94Gly* mutation. No significant differences in the mutation spectrum depending on the *M. tuberculosis* genotype were found.

In the studied sample of 40 patients from whom ofloxacin-resistant *M. tuberculosis* strains were isolated, clinical forms of infiltrative and disseminated pulmonary TB prevailed (16 and 14 patients, respectively; **Table 3**). Comparison of clinical forms of the disease and genotype of strains did not reveal statistically significant differences. The proportion of disseminated pulmonary TB was higher in patients infected with Central Asian/Russian strains (41.7%; 5/12) than with B0/W148 (27.8%; 5/18;  $p = 0.4$ ). The proportion of patients with infiltrative pulmonary TB was higher in the B0/W148 group (55.6%; 10/18) than Central Asian/Russian (33.3%; 4/12;  $p = 0.2$ ). It is possible that statistically insignificant differences between groups are due to small sample size or different reactivity of patient's body.

We compared our results with previous Russian studies [7, 8, 15, 26, 27]. As in our study, *gyrA* mutations *94Gly*, *90Val*, *94Ala* were the most frequent, regardless of the region of Russia. In the second edition of the WHO Catalog [15] published in 2023 for the new fluoroquinolone moxifloxacin, the most frequent of these *gyrA* mutations, *Asp94Gly*, was identified to be leading with high confidence to a high level of resistance to moxifloxacin, along with *gyrA Gly88Cys*, *Asp94Asn*, *Asp94His*, and *Asp94Tyr*. Other mutations in *gyrA* and *gyrB* have been identified to be resulting in low levels of resistance to moxifloxacin.

Mutations in *gyrB*, which are not included in the test system used in this study, are generally rare [8, 15] or have not been detected at all in some local collections [26], although, for example, found in 10% of ofloxacin-resistant strains in the Leningrad region [18]. Some ofloxacin-resistant strains do not carry mutations in *gyrA* or *gyrB* [15, 18]. Their resistance to ofloxacin can be hypothetically explained by a mutation in another target gene or active efflux [28, 29].

The reverse situation, namely multiple mutations in the same strain, was not observed in the studied sample, but was described earlier in other Russian studies. For example, in a study of a collection of strains from different regions of Russia, 4 isolates carried *gyrA*

*Asp94Gly* and *gyrB Asn538Asp* mutations simultaneously, 1 Beijing B0/W148 strain had *gyrA (Ala90Val-Ser91Pro, Asp94Asn)* and *gyrB (Ala543Val)* mutations simultaneously [7]. There is no correlation between the level of phenotypic resistance and the type of mutation or the presence of more than 1 mutation. In the Leningrad region in 2011, 54.3% of isolates with a low level (2 µg/mL) and 76.9% of isolates with a high level (10 µg/mL) of ofloxacin resistance had mutations in *gyrA* [18]. Two isolates with low levels of ofloxacin resistance had mutations in *gyrA* and *gyrB* genes simultaneously, and major mutations in *gyrA* codons 94 and 90 were found among strains with both high and low levels of resistance [18]. This contradicts the statement in the WHO Catalog [14] that “multiple genetically linked mutations with low levels of resistance to moxifloxacin have an additive effect and should be considered as conferring high levels of resistance”. Hypothetically, multiple mutations could arise due to mutator (hyper-mutable) alleles of DNA repair genes in such strains, similar to the situation with rifampicin resistance and multiple mutant alleles of *rpoB* [30].

An interesting result of a previous study in north-western Russia was the detection of a high proportion of heteroresistant isolates, i.e., those with both mutant alleles and wild-type *gyrA* or *gyrB* alleles [15]. However, this current study did not detect such cases, i.e., strains with already persistently acquired resistance to ofloxacin are actively spreading at present.

## Conclusion

The widespread use in the past of phenotypic drug resistance testing based on absolute concentration method data may have led to false results, which further increases the importance and necessity of genetic typing. The new version of the guidelines [13] includes additional provisions that prioritize the proportion method over the absolute concentration method in phenotypic susceptibility testing of *M. tuberculosis* clinical isolates to antituberculosis drugs. Critical concentrations for rifampicin (0.5 mg/L instead of 1 mg/L), levofloxacin (1.0 mg/L instead of 1.5 mg/L), moxifloxacin (0.25 and 1 mg/L instead of 0.5 and 2.0 mg/L) were changed according to WHO recommendations. This complicates retrospective comparison of phenotypic drug suscepti-

**Table 3.** Distribution of clinical forms of the disease among strain genotypes

Clinical forms of tuberculosis	Total	B0/W148-cluster	Central Asian/ Russian	Beijing, other	non-Beijing
<i>n</i>	40	18	12	4	6
Disseminated	14	5	5		4
Infiltrative	16	10	4	1	1
Fibrous-cavernous	6	2	2	1	1
Cavernous	2	1		1	
Focal	2		1	1	

bility data and further strengthens the role of molecular genetic studies aimed at establishing genetic markers of resistance.

In the studied sample of *M. tuberculosis* strains from different regions of northwestern Russia collected in 2015-2019, primary resistance to fluoroquinolones amounted to 6.7% in the general population and 17.4% in MDR strains and was mainly due to *Asp94Gly* and *Ala90Val* mutations in the *gyrA* gene. The largest proportion of fluoroquinolone-resistant *M. tuberculosis* strains was represented by the Beijing B0/W148 genotype.

In the population of *M. tuberculosis* in northwestern Russia, resistance to fluoroquinolones is currently forming against the background of already existing MDR, and strains with *Asp94Gly* and *Ala90Val* mutations in the *gyrA* gene play a major role in the spread of pre-SDR-TB. It is advisable to detect mutations in genes associated with resistance of *M. tuberculosis* to antituberculosis drugs and monitor the circulation of these genotypes to evaluate their epidemiologic significance.

#### 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>
- Mujuni D., Kasemire D.L., Ibanda I., 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>
- 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>
- 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.
- WHO. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva;2023.
- 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>
- 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>
- 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.
- 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>
- 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/brnflky>
- 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>
- 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>
- 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., McNerney 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>

**Information about the authors**

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

*Natalya S. Solovyova* — 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>

*Vyacheslav 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*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of Molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, [imokrousov@mail.ru](mailto: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

**Информация об авторах**

*Вязовая Анна Александровна*<sup>✉</sup> — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, [elmtree2001@mail.ru](mailto: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>

*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*<sup>✉</sup> — д.б.н., зав. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, [imokrousov@mail.ru](mailto: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



# 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<sup>✉</sup>, Vladimir V. Zverev, Natalya V. Ponomareva, Artem V. Leonov, Alexander Yu. Kashnikov, Natalia V. Epifanova, Anastasia V. Polyamina, 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., 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. *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/izgdtj>



Оригинальная статья

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

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

Селиванова С.Г.<sup>✉</sup>, 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 иммунологии*. 2024;101(3):351–361.

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

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

## Introduction

Enteroviruses (*Picornavirales: Picornaviridae: Enterovirus*; EVs) are small in size (30 nm diameter), non-enveloped, icosahedral (pseudo T = 3) capsid (+) RNA-containing viruses. An important role in human infectious pathology is played by non-polio EVs (NPEVs), represented by more than 100 types belonging to 4 species: *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*<sup>1</sup>. In most cases, infection with NPEV is asymptomatic, but these viral agents can also be associated with central nervous system damage, myocarditis, neonatal sepsis, and other serious diseases [1–4]. It is important to note that NPEVs of different species and types can cause the same clinical syndromes, and the intestinal form of EV infection (EVI) can accompany infection with any type of EV [5].

EVs play an important role in the epidemic surges and outbreaks that have been reported in many countries. For example, a large-scale outbreak of EV-D68-respiratory disease with neurologic syndrome was recorded in 2014 in the United States and Europe [6, 7]; furthermore, periodic outbreaks of oral and extremity exanthema (EB-A71 infection) in the Asia-Pacific region [8] and serous meningitis (EVM) in Europe, the United States and Russia (CMV3, ESNO30) are also registered [9–11].

The diversity of clinical symptoms of varying severity, the risk of emergence and wide spread of epidemic variants of the virus among the population determine the relevance of worldwide studies aimed at molecular genetic monitoring of circulating EV strains<sup>2</sup> [12]. In Russia, monitoring the circulation of NPEV is an integral part of epidemiologic surveillance of EVI<sup>3</sup>, which allows predicting epidemic outbreaks and the formation of foci of infection, and making timely management decisions.

Previously, we have shown the importance of examination of children with acute intestinal infection (AII) for molecular monitoring of EV circulation. Annual detection and a diverse type landscape of NPEVs, including not only *Enterovirus A* and *Enterovirus B* (pathogens of herpangina, exanthema, serous meningitis, etc.), but also latently circulating *Enterovirus C* NPEVs (mainly minor forms of infection, acute respiratory viral infections, AII), allow us to additionally obtain data expanding information on the specifics of circulation of EVs of different species [13, 14].

In 2019, a disease (COVID-19) caused by a novel coronavirus (SARS-CoV-2) was reported in Wuhan, China, which spread very rapidly around the world. In March 2020, WHO declared a pandemic of the disease and the need to introduce anti-epidemic measures aimed at reducing the activity of spread of the virus transmitted by airborne and household contact<sup>4</sup>. The widespread introduction of the emergency regime has affected the incidence not only of COVID-19, but also of other infectious diseases, mainly viral in nature. For example, in Oslo (Norway) in 2020–2021, the number of hospitalizations of children with acute bronchiolitis, viral pneumonia, gastroenteritis and viral infections of the central nervous system decreased by 90, 89, 74 and 78%, respectively, compared to previous years [15]. Japanese researchers reported that the number of patients with influenza, respiratory syncytial virus, human metapneumovirus and *Mycoplasma pneumoniae* with respiratory symptoms decreased dramatically by more than 98% during the restrictive measures [16]. Other studies have also reported a decrease in the incidence of various infections of viral etiology in children during the COVID-19 pandemic, including a decrease in the detection rate of enteric viruses (rotaviruses by 87% and noroviruses by 40%) [17].

In Russia during the year 2020, against the background of unprecedented anti-epidemic and preventive measures aimed at combating the COVID-19 pandemic, a significant decrease in the incidence of EVI/EVM was observed. In 2021 and 2022, there was a gradual increase in incidence and the rates returned to the average annual level before the pandemic (2010–2019) [18].

**The aim** of this study is to characterize the prevalence and type diversity of NPEV in children with AII in the period of 2018–2023, which includes the COVID-19 pandemic.

## Materials and methods

In this study, 7302 fecal samples of children aged 0–17 years hospitalized with a diagnosis of AII (A08.4 — viral intestinal infection unspecified, ICD-10) in a pediatric infectious disease hospital in Nizhny Novgorod in 2018–2023 were examined for the presence of EV and viruses — causative agents of acute gastroenteritis (rotaviruses, noroviruses, adenoviruses, astroviruses).

Voluntary informed consent was obtained from all participants or their legal representatives. The study protocol was approved by the local Ethical Committee of the Academician I.N. Blokhina Nizhniy Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 5 of 24.03.2020).

<sup>1</sup> Picornaviridae Home Page. URL: <https://picornaviridae.com/ensavirinae/enterovirus/enterovirus.htm> (date of access: 13.03.2024).

<sup>2</sup> 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> (date of access: 13.03.2024).

<sup>3</sup> “Epidemiological surveillance and prevention of enterovirus (nepolio) infection for 2023–2027” Program. URL: [https://fcgie.ru/page,3,koord\\_tsentr.html](https://fcgie.ru/page,3,koord_tsentr.html) (date of access: 13.03.2024).

<sup>4</sup> 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> (date of access: 13.03.2024).

RNA of entero-, rota-, noro-, astroviruses and DNA of adenoviruses from fecal samples were isolated using the RIBO-prep reagent kit, for reverse transcription we used the REVERTA-L kit (Central Research Institute of Epidemiology). Detection of RNA of EV and enteric viruses was performed using AmpliSens Enterovirus-FL and AmpliSens Viro-Screen-FL test systems (Central Research Institute of Epidemiology) according to the manufacturer's instructions.

Samples containing EV RNA were used to determine the virus type. For the same purpose, 123 EV-containing fecal samples of children with AII provided by the CDC in the Nizhny Novgorod region in 2018–2023 were additionally investigated.

The EV type was determined by partial sequencing of the gene encoding capsid protein 1 (VP1). The 375 bp fragments of the EV genome were amplified according to the recommendations [19]. The nucleotide sequences of cDNA fragments were determined in automatic analyzers GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter) and Nanofor-05 (Institute of Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences) using DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) and GenSek (Syn- to) reagent kits.

To identify closely related EV strains, the nucleotide sequences of VP1 gene fragments were analyzed using the online resource BLAST<sup>5</sup>.

Statistical processing of the results was carried out using the generally accepted method of calculating the mean error ( $m$ ) and Student's mean and probability ( $t$ ) using an online calculator<sup>6</sup>.

The multi-year dynamics of the incidence of EVI in children under the age of 17 in the Nizhny Novgorod region was analyzed on the basis of official statistics (Form No. 1 of statistical reporting "Information on infectious and parasitic diseases") for the years 2018–2023.

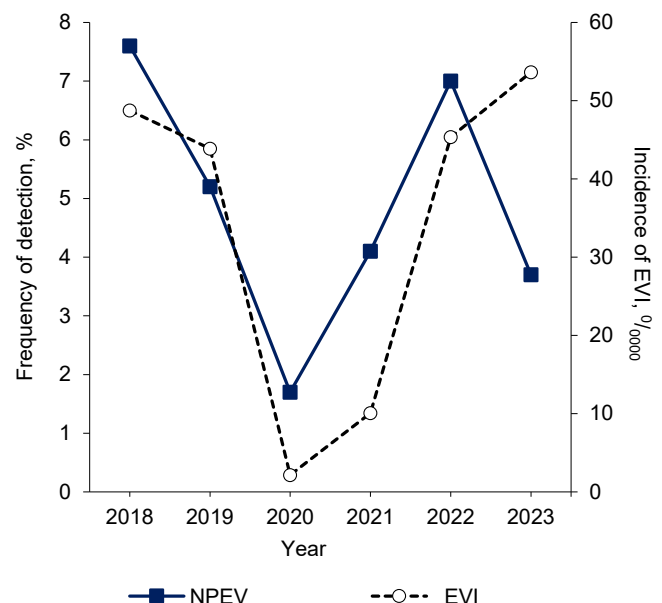
## Results

### *Detection of enteroviruses in children with acute intestinal infection*

A total of 7302 children hospitalized with a diagnosis of AII in 2018–2023 were examined for the presence of EV RNA in feces. The detection of EVs was performed as part of the etiologic interpretation of the disease. Enteric viruses (rotaviruses, noroviruses, astroviruses, and group F adenoviruses) and EVs combined were detected in 46.9% of cases (3424/7302), with EVs detected both as mono-infection (2.7%; 195/7302) and in combination with viruses that were pathogens of acute gastroenteritis (2.3%; 169/7302).

EVs were detected in 364 ( $5.0 \pm 0.3\%$ ) cases. In different years of the observed period, the frequency of EV detection in children with AII ranged from 1.7–7.8%. In the period before the COVID-19 pandemic, EVs were significantly more frequently detected in 2018 ( $7.5 \pm 0.7\%$ ; 120/1607;  $p = 0.009$ ). Their detection rate decreased in 2019 and reached a minimum in 2020 ( $1.7 \pm 0.3\%$ , 24/1427;  $p = 0.0000001$ ), when pandemic-related restrictive anti-epidemic measures were implemented. In 2021, after the partial lifting of the lockdown and when the mask regime was relaxed, the rate of EV detection in children with AII increased significantly ( $4.1 \pm 0.5\%$ ; 58/1417;  $p = 0.00004$ ) and peaked in 2022 ( $7.8 \pm 0.9\%$ ; 65/832;  $p = 0.002136$ ). **Fig. 1** shows that the dynamics of the frequency of EV detection until 2023 repeats the dynamics of the incidence of all forms of EVI in children in the Nizhny Novgorod region. Both dynamics have a pronounced decrease in rates in 2020 and an increase in 2021–2022. However, in 2023, the increase in the incidence of EVI continued, and the frequency of EV detection in children with AII significantly decreased ( $3.7 \pm 0.9\%$ ; 18/493;  $p = 0.000001$ ) compared to 2022. Comparison of the incidence rates of EVI and EVM in the analyzed time period revealed that the increase in the incidence rate in 2023 was due to non-meningeal forms of infection (in 2022 —  $31.82^{0/0000}$ ; in 2023 —  $42.38^{0/0000}$ ). The incidence of EVM remained approximately the same (in 2022,  $13.52^{0/0000}$ ; in 2023,  $12.42^{0/0000}$ ).

The monthly frequency of EV detection in different age groups of children with AII in 2018–2022 was analyzed. It was found that in 2018 and 2019 the dynamics of changes in the frequency of EV detection was homogeneous. A similar pattern was observed



**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.

<sup>5</sup> BLAST. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (date of access: 13.03.2024).

<sup>6</sup> Medical statistics. URL: <https://medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html> (дата обращения 13.03.2024).

when comparing the seasons of 2021 and 2022, which made it possible to single out the combined seasons of 2018–2019 (pre-pandemic) and 2021–2022 (pandemic, cancellation of the lockdown) for comparison. The analysis showed that before the pandemic, EVs were detected in children with intestinal infection year-round, starting in April and ending in January–February of the following year. Peaks were recorded in May (10.0%; 22/221) and September (15.8%; 38/241). In 2020, EV detection peaked in September (5.7%; 7/123). During the 2021–2022 pandemic season, after phasing out restrictive measures, EVs in children with AII were detected from June through December, with a peak detection rate in July (10.8%; 34/315). In the 2023 season, EVs were more frequently detected in August (8.2%; 6/73) (Fig. 2).

Children of all ages are susceptible to NPEV infection. At the same time, the frequency of EV detection in patients with AII differed in different age groups during the study period (Fig. 3). Thus, prior to the COVID-19 pandemic, EVs were significantly more frequently detected in children under 3 years of age ( $7.3 \pm 0.6\%$ ; 120/1644;  $p = 0.006739$ ), whereas in 2021–2022, EVs were most frequently detected in children aged 3–7 years ( $6.8 \pm 0.9\%$ ; 53/778;  $p = 0.044991$ ) compared to children older than 7 years. In 2020 and 2023, against a background of low detection rates of EVs in children with AII, no significant group differences were found, with no EVs detected in children over 7 years of age in the 2023 season, despite the fact that the number of children aged 7–17 years examined in 2022 and 2023 differed little (169 and 118, respectively).

It was of scientific and practical interest to study the peculiarities of the type composition of EVs found in children with AII before the COVID-19 pandemic, during the pandemic and after its end.

#### Analysis of the diversity of NPEV types in children with AII

In order to study the diversity of EV types detected in hospitalized children diagnosed with AII, 299 typed strains were analyzed. All strains were identified as NPEVs.

A total of 41 types of NPEV identified in 2018–2023 were defined. Fig. 4, a shows that a number of NPEV types were identified in a single or small number of cases ( $n = 64$ : KA3, KA7, KA8, EV-A76, EV-A90, KV1, KV2, KV3, KV4, E1, E2, E3, E6, E7, E13, E14, E18, E21, E24, E25, KA19, KA20, KA21, KA24, EV-C99, EV-C116, EV-D68), while other types were detected relatively frequently ( $n = 135$ : KA2, KA5, KA10, EVA71, KA9, KV5, E9, E11, E30, KA22), 4 viruses were prevalent ( $n = 100$ : KA4, KA6, KA16, KA1). The detected viruses belonged to 4 species: *Enterovirus A* (44.5%; 133/299), *Enterovirus B* (35.1%; 105/299); *Enterovirus C* (20.1%; 60/299); *Enterovirus D* (0.3%; 1/299).

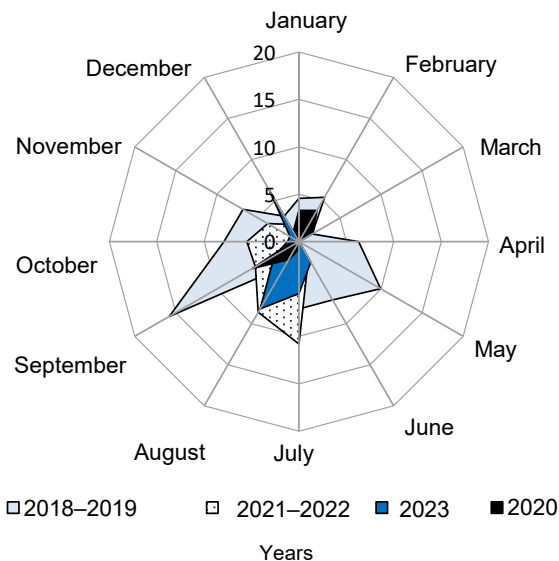


Fig. 2. Monthly frequency of detection of NPEV in children with AII during the period before the COVID-19 pandemic and after the lifting of the lockdown, %.

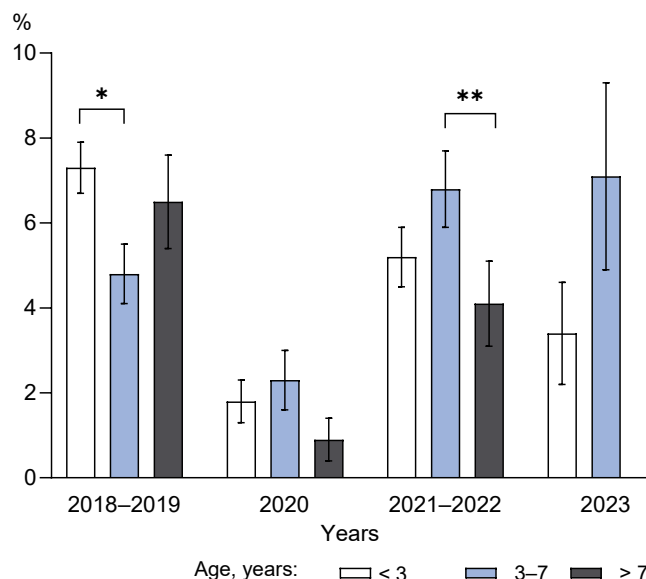


Fig. 3. Frequency of detection of EVs in different age groups of children with AII in the periods before the pandemic, during and after the COVID-19 pandemic.

\* $p = 0.006739$ ; \*\* $p = 0.044991$ .

Twelve types of *Enterovirus A* species were identified among the NPEVs, with KA4 (18.8%; 25/133), KA6 (14.3%; 19/133), and KA16 (15%; 20/133) viruses being detected more frequently. *Enterovirus B* species included 20 types of NPEVs, dominated by viruses KA9 (11.4%; 12/105), KV5 (15.2%; 16/105), E11 (14.3%; 15/105), and E30 (13.3%; 14/105). Eight types of *Enterovirus C* NPEVs were identified, with KA1 virus being the most frequently detected (60%; 36/60). RNA of EV-D68 was detected in feces in one case.

The spectrum of NPEV types in different seasons of the study period was analyzed (Fig. 4, b). Thus,

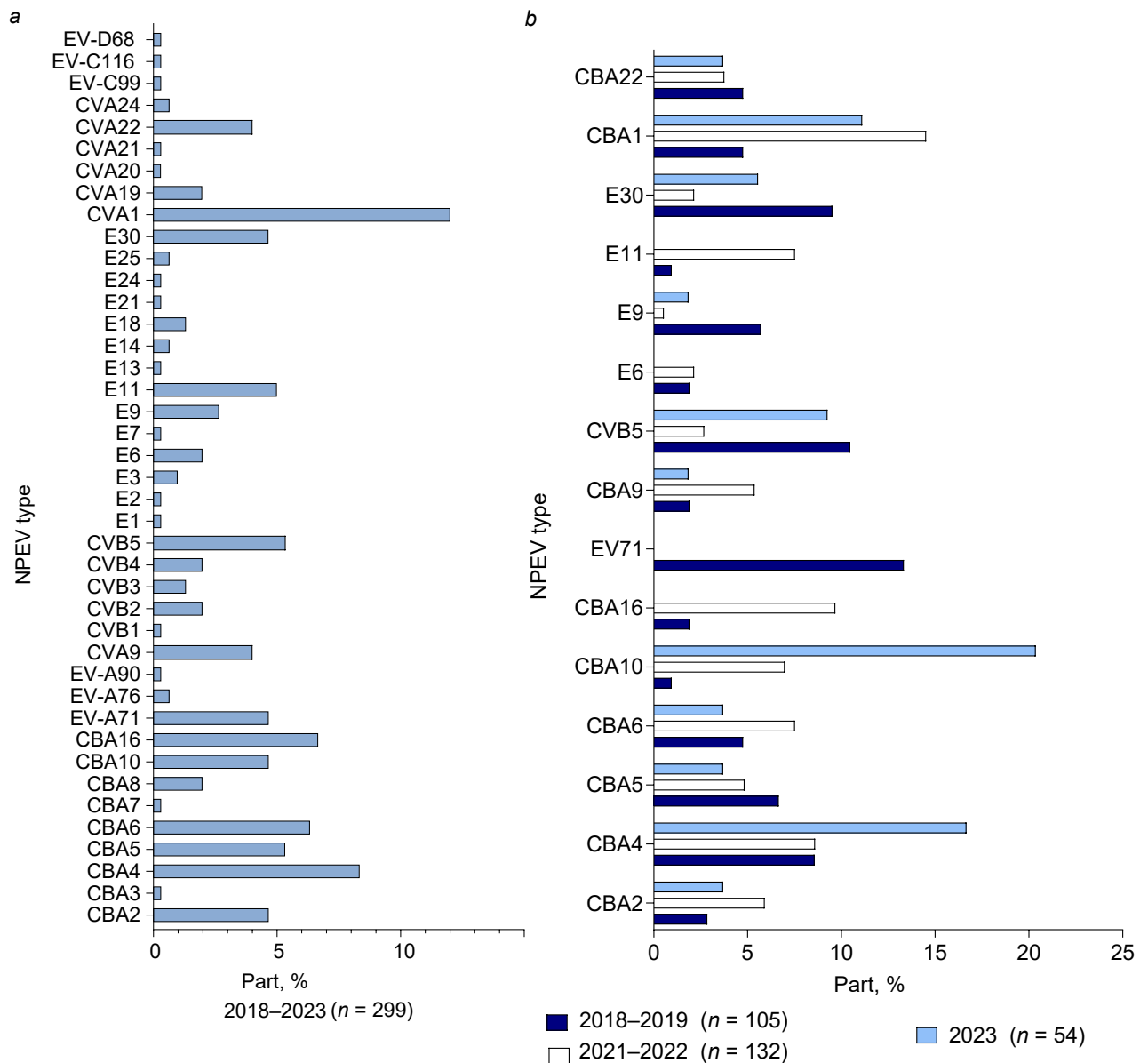
before the COVID-19 pandemic, *Enterovirus A* was dominated by EV-A71 (13.3%; 14/105), which was subsequently undetected, and was replaced by virus KA16 (13.6%; 18/132). In 2023, KA4 (16.7%; 9/54) and KA10 (20.4%; 11/54) viruses were dominant. KA2, KA5 and KA6 viruses were detected relatively frequently. It is indicative that in 2020, in the conditions of strict anti-epidemic measures, representatives of *Enterovirus A* were not identified.

In 2018–2019, among *Enterovirus B*, KV5 (10.5%; 11/105), E30 (9.5%; 10/105) and E9 (5.7%; 6/105) viruses were detected more frequently than others; in the 2020 season, E9, E14 and E24 viruses were detected in single cases, whereas after the partial lifting of restrictive measures, KA9 (6.8%; 9/132) and E11 (10.6%; 14/132) viruses were detected. In 2023, KV5 virus

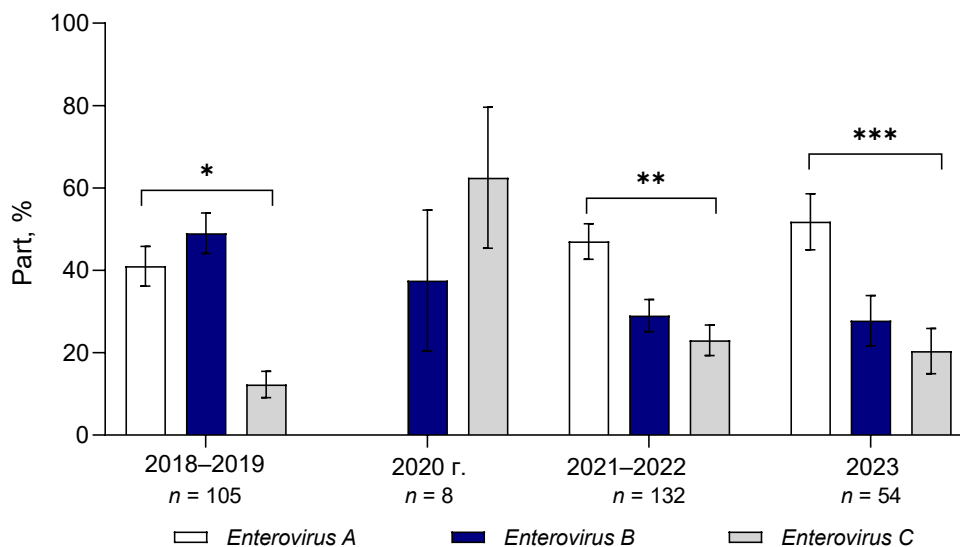
(9.3%; 5/54) resumed circulation and E30 virus (5.6%; 3/54) was detected, while other EVM pathogens (E6 and E11 viruses) were not detected in the feces of children with AII.

Among *Enterovirus C* EVs, KA1 virus dominated both before the pandemic and during the pandemic (during the restrictive measures and after the lockdown was lifted). It is worth noting that in 2021–2022, its share in the type structure of NPEVs detected in children with AII amounted to 16% (21/132).

We analyzed the distribution of NPEV types in different seasons of the study period. **Fig. 5** shows that before the COVID-19 pandemic, *Enterovirus A* ( $41.0 \pm 4.8\%$ ; 43/105) and *Enterovirus B* ( $46.7 \pm 4.9\%$ ; 49/105) were detected in approximately equal proportions and statistically significantly predominated over *Enterovi-*



**Fig. 4.** Diversity of NPEV types identified in children with AII in 18–2023 (a), before the pandemic (2018–2019), during the pandemic (2021–2022) and after its end (2023) (b).



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

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

*rus C* ( $12.3 \pm 3.2\%$ ; 13/105;  $p = 0.000001$ ), while after the lockdown was lifted (2021–2022), *Enterovirus A* ( $47.0 \pm 4.3\%$ ; 62/132;  $p \leq 0.002142$ ) was more frequently detected. During the period of the severe restrictive measures due the pandemic (2020), no EVs of *Enterovirus A* species were detected, and the major proportion among identified NPEVs belonged to *Enterovirus C* species ( $62.5 \pm 17.1\%$ ; 5/8). In 2023, the distribution of NPEV species did not differ significantly from that in 2021–2022 and was characterized by a significant predominance of *Enterovirus A*.

Thus, during the period under study, children with AII showed a change in the frequency of detection of different types of NPEVs due to the change of the dominant type: before the pandemic — *Enterovirus B* (46.7%), *Enterovirus A* (41.0%), *Enterovirus C* (12.3%); during the pandemic season, during the period of strict restrictions (2020), *Enterovirus C* (62.5%) and *Enterovirus B* (37.5%) were detected; after the lockdown was lifted, *Enterovirus A* (47.0%), *Enterovirus B* (28.8%), *Enterovirus C* (23.5%), *Enterovirus D* (0.7%); in 2023, *Enterovirus A* (51.8%), *Enterovirus B* (27.8%), and *Enterovirus C* (20.4%) were detected.

## Discussion

Many types of EVs are prone to epidemic spread, which determines the need to monitor their circulation. For this purpose, detection and type identification of NPEVs are performed in patients with different clinical presentation of the disease. In the present study, detection and type identification of EVs were performed in children hospitalized with AII in one of the infectious diseases hospitals of Nizhny Novgorod, as part of the etiological deciphering of the disease during the period including the time of the COVID-19 pandemic.

In 2018–2023, EVs both in mono-infection and in combination with other enteric viruses were detected in an average of 5.0% of cases. At the same time, before the pandemic (2018–2019), the frequency of EV detection was 6.4%, which is comparable to the data for 2006–2011, when in children hospitalized with AII in the same infectious disease hospital in Nizhny Novgorod, NPEVs were detected in  $7.6 \pm 0.3\%$  of cases [14]. According to the data of foreign authors, EVs in children with AII before the COVID-19 pandemic were detected in the range of 3.3–11.0% [20–22].

The analysis of the incidence of all forms of EVI in the Nizhny Novgorod region and the frequency of EV detection in children diagnosed with AII showed that in 2018–2022 the dynamics of the frequency of EV detection repeated the dynamics of EVI incidence, and in 2020 in both cases a sharp decline in the studied indicators was observed. The incidence of EVI in children under 17 years of age in the Nizhny Novgorod region decreased by 22.7 times (according to official statistics), the frequency of EV detection — by 4.5 times. In 2020, in connection with the COVID-19 pandemic, anti-epidemic measures (mask regime, ban on mass events, self-isolation regime, quarantine, hygiene awareness, movement restrictions) were introduced in the Nizhny Novgorod region, as well as in the country as a whole, aimed at preventing the spread of SARS-CoV-2 due to the airborne transmission. At this time, the incidence of EVI in children under 17 years of age in the Nizhny Novgorod region decreased to 2.16 per 100,000, and the frequency of NPEV detection in children with AII reached a minimum (1.7%). These data indicate an effect of restrictive anti-epidemic measures on the activity of EV circulation, which can be transmitted via different mechanisms and routes, and, accordingly, the impact on the EVI incidence.

In 2021–2022, against the background of a marked increase in the incidence of all forms of EVI, the frequency of EV detection in children with AII increased, averaging 5.5% (4.1–7.8%). The gradual increase in the detection rate correlates with the results of a study conducted in the Republic of Belarus in 2020–2022, where NPEVs in children with AII were identified in a total of 3% of cases, and the annual detection rate also tended to increase (1.1–3.7%) [23]. However, after the pandemic in 2023, against the background of an increase in the incidence of all forms of EVI, the frequency of EV detection in children with the symptoms of AII significantly decreased by 2.1 times (7.8–3.7%).

EVs were detected in fecal samples during the seasonal summer-autumn rise in the incidence of EVI in all age groups of children hospitalized with AII. However, the peak months and the dominant age group of their detection varied in different years of the study period. Before the pandemic, the highest EV detection rates were recorded in May and September, predominantly in the age group of children under 3 years of age, while after the cancellation of the lockdown — in July, in the age group of 3–7 years (organized preschool children). It is noteworthy that in 2023 there were no cases of EV detection in children with AII in the age group older than 7 years, which is characterized by a high incidence of EV causing neurological forms of infection (KV5, E6, E30) [24]. The decrease in the frequency of EV detection in children hospitalized with AII in 2023 and the absence of cases of their detection in the age group older than 7 years may be associated, among other things, with the emergence in the general EV population of new epidemically significant EV variants causing specific clinical forms of EVI.

During 2018–2023, we identified 41 types of NPEV in children with a clinic of AII. The spectrum of EB types included widespread pathogens of exanthemal forms of infection and neuroinfections (in 2018 — KV5, E9, E30, EV-A71; in 2019 — KA6, KA4, EV-A71, E6; in 2021 — KA6, KA9, E11; in 2022 — KA6, KA5, KA16, KA9, E11; in 2023 — KA6, KA10, E30), which reflects the type composition of the Nizhny Novgorod EV population. Thus, in the Volga Federal District, including the Nizhny Novgorod region, during the pre-pandemic period, viruses E6, E30, KA6, EV-A71 circulated widely [25]; in 2021, KA6 was dominant, KA10 and KA9 were identified<sup>7</sup>.

In addition to EVs, which are the etiologic cause of various symptomatic diseases, the types found, as a rule, in minor or intestinal forms of infection (KA3, E1, E2, E3, KA20, KA21, KA22, KA24, EV-C116) and types rarely detected in Russia (EV-A76, EV-A90, EV-C99) were identified in children with AII. The iden-

tification of rarely occurring types of NPEV in fecal samples of children with intestinal infection has completed the characterization of the type composition of the EV population in Nizhny Novgorod. The importance of screening of children with AII to detect rare types of NPEVs is also indicated by the results of a study conducted in Mozambique in 2014–2018 [26].

EVs detected in children with AII were of 4 types: *Enterovirus A* (44.5%), *Enterovirus B* (35.1%), *Enterovirus C* (20.1%), *Enterovirus D* (0.3%). Meanwhile, 27 types were identified before the COVID-19 pandemic, 5 types were identified during the 2020 pandemic, 24 after the lifting of restrictive measures during the pandemic, and 20 after the pandemic. The number of NPEV types detected in children with diarrheal disease at different time periods in different territories can vary considerably. In our previous study, 22 types of *Enterovirus A* (38.6%), *Enterovirus B* (38.6%), and *Enterovirus C* (20.8%) were identified during the typing of EVs detected in children with AII in 2006–2011 [14]. According to the data of foreign authors, in children examined in cases of AII, *Enterovirus B* and *Enterovirus C* types of NPEVs were detected more often. Thus, in India, 23 types of EVs, mainly of *Enterovirus B* species (73.68%; 28/38), were identified during the examination of 305 children with AII in 2011–2012 [27]. In Northern Brazil, in 2010–2011, 19 types of EV were identified in 175 children with symptoms of acute gastroenteritis, with 11 types (61.1%; 22/36) belonging to the *Enterovirus B* species [28]. In contrast, in North America in 2012, only 8 types of *Enterovirus A* and *Enterovirus B* were identified in children with acute gastroenteritis, and *Enterovirus C* was not detected in children with AII [21].

Analysis of the relative species distribution of NPEVs identified in children with AII in 2018–2023 showed that the ratio of EV species changed over time. For example, prior to the COVID-19 pandemic, *Enterovirus A* and *Enterovirus B* species EVs were predominantly identified, in approximately equal proportions. During the pandemic (2020), during the period of strict restrictive anti-epidemic measures, *Enterovirus C* EVs were predominantly identified (Coxsackie A1 predominated), *Enterovirus B* in isolated cases, and none of the *Enterovirus A* types were identified. The latter resumed their circulation after the relaxation of restrictive measures and the end of the pandemic and dominated the spectrum of viruses detected. A significant decrease in the incidence of oral and extremity exanthema and herpangina, the main pathogens of which are EV-A71 and CA16, during the pandemic was observed in studies conducted in China [29, 30], which, according to the authors, indicates the prevention of EV transmission by aspiration and contact mechanisms due to the application of anti-epidemic measures. Our study shows differences in the effectiveness of restrictive measures aimed at blocking the airborne transmission of SARS-CoV-2 on the frequency of detection of different types of

<sup>7</sup> Informative electronic bulletin. 2022. № 9. С 3–16. URL: <https://nniiem.ru/file/publicat/2022/nniiem-inf-byulleten-evi-za-2021-n9.pdf> (date of access: 27.02.2024).

EVs in children with acute respiratory tract infections, which, most likely, is a consequence of their realization of different transmission mechanisms.

### Conclusion

The data of 6-year monitoring of NPEVs in children with AII demonstrate their genetic diversity, represented by at least 41 virus types of *Enterovirus A–D* species. The spectrum of types includes the main causative agents of serous meningitis, oral and extremity exanthema, herpangina, exanthema, myocarditis and rare types occurring in minor or intestinal forms of infection, which complements the characterization of the territorial EV-population.

The results of the study demonstrate a pronounced effect of the influence of the complex of anti-epidemic measures carried out during the COVID-19 pandemic on the incidence of EVI and the activity of circulation of NPEV of different types. In children with AII under the conditions of blocking the aspiration mechanism of SARS-CoV-2 transmission, there was a decrease in the frequency of detection of *Enterovirus B*, absence of *Enterovirus A* and constant presence of *Enterovirus C* in feces.

### 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. Энтеновирусы в Российской Федерации в 2013 г. В кн.: *Информационный электронный бюллетень «Заболееваемость, 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. Nizhnii Novgorod; 2014:12–5. EDN: <https://elibrary.ru/xvuvof>
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/rszlbld>
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. Энтеновирусы 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. Энтеновирусная (неполио) инфекция в Российской Федерации в 2022 г. В кн.: *Заболееваемость, 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. Nizhnii Novgorod; 2023:3–5. EDN: <https://elibrary.ru/iyyode>
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*. Nizhnii 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>

### Information about the authors

**Svetlana G. Selivanova**<sup>✉</sup> — 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](mailto: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. Polyamina** — 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; *Polyamina 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

### Информация об авторах

**Селиванова Светлана Григорьевна**<sup>✉</sup> — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, [svetafor22@mail.ru](mailto: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>

**Полямина 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; *Полямина 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

Original Study Article

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

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

Grigorii A. Pechkovskii<sup>1</sup>, Evgeny I. Eremenko<sup>1</sup>, Alla G. Ryazanova<sup>1</sup>, Sergey V. Pisarenko<sup>1</sup>, Nikolay A. Shapakov<sup>1</sup>, Lyudmila Yu. Aksenova<sup>1</sup>, Olga V. Semenova<sup>1</sup>, Lyudmila D. Timchenko<sup>2</sup>, Alexander N. Kulichenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia;

<sup>2</sup>North-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/kjnhyg>

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.<sup>1✉</sup>, Еременко Е.И.<sup>1</sup>, Рязанова А.Г.<sup>1</sup>, Писаренко С.В.<sup>1</sup>, Шапаков Н.А.<sup>1</sup>, Аксенова Л.Ю.<sup>1</sup>, Семенова О.В.<sup>1</sup>, Тимченко Л.Д.<sup>2</sup>, Куличенко А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

<sup>2</sup>Северо-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 (ST1), 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 (ST1), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 и B.Br.001/002.

**Заключение.** Использование разработанной методики идентификации вариабельных 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>

## Introduction

*Bacillus anthracis* is a spore-forming Gram-positive bacillus, the pathogen of anthrax, a particularly dangerous infection with a global distribution area. In early studies, attempts to determine the genetic variability of *B. anthracis* were unsuccessful, indicating the high genetic monomorphism of this species [1]. The first genetic marker suitable for differentiation of *B. anthracis* strains was tandem repeats in the chromosomal locus *vrrA*, which are sequentially repeated identical DNA fragments (variable number tandem repeats, VNTR) [2]. Allelic variants of *vrrA* with the number of repeats from 2 to 6 allowed all strains to be divided into 5 groups [2, 3]. The marker was included in the first typing scheme by MLVA8 (Multiple loci VNTR analysis, MLVA) consisting of 6 chromosomal and 2 plasmid VNTR loci. VNTR loci in general differ from other variable regions in the fact they have a high frequency of variability and a larger number of variants, as well as the manifestation of the homoplasmy effect, i.e. independent or parallel mutations in different genetic lineages [4]. Therefore, genotyping based on the analysis of VNTR loci makes it difficult to study intraspecific evolution, but this method is convenient for epidemiologic investigation of anthrax outbreaks. Active searches for *B. anthracis* loci with tandem repeats led to the discovery of 32 VNTR markers in 6 MLVA genotyping schemes [5–10].

In order to study genetic diversity, a genotyping method based on the analysis of canonical SNPs (canSNP typing) with the identification of 12 major genetic lineages was developed and tested on a large selection of strains [8]. The canonical lineages most accurately reflect the evolutionary groups of *B. anthracis*; therefore, they are best suited to describe the distribution of anthrax strains in the world. Subsequently, large-scale phylogenetic studies were performed with detailed descriptions, creation of a nomenclature of names and relationships of genetic clusters. Subclusters of canonical lineages were assigned numbers or trivial names [11, 12]. In particular, the canonical lineage A.Br.008/009 includes the Tsiankovskii and STI subclusters, which are widely represented in the Commonwealth of Independent States.

In 2019, an anthrax outbreak occurred in the Republic of Dagestan with isolates that clustered into a separate phylogenetic group A.Br.125 belonging to the STI subcluster.

The canonical lineage B.Br.001/002 contains the Siberia and Europe clusters, making up B.Br.014, as well as the Asia and B.Br.018 clusters.

Taking into account the established and newly identified designations of genetic lineages and groups, we used the following order in the subsequent description. The canonical lineage is indicated first, followed by a new subgroup or cluster within it with an established designation, if identified. For example, most strains of

the main lineage A, isolated in Russia, are designated as A.Br.008/009 (Tsiankovskii) or A.Br.008/009 (STI).

Molecular markers also include INDELs (insertion/deletion), which are non-repeat variable regions that exist predominantly as two genetic variants: with deletion or with insertion.

For *Francisella tularensis*, an INDEL typing scheme was developed, including 38 INDEL loci. The study showed that the use of such markers increases the accuracy of typing [13]. Genotyping methods based on INDEL-locus analysis have also been developed for *Helicobacter pylori*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis* and proved to be of high resolution and reliable in determining the phylogenetic position of strains [14–17]. Currently, the INDEL genotyping system for *B. anthracis* has not been developed.

**The objectives** of the study were to find and characterize 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), 66 from the collection of pathogenic microorganism genomes of the Stavropol Anti-Plague Institute, described earlier [12]. Genome numbers are given in Appendix 1 on the journal website (<https://doi.org/10.36233/0372-9311-487-s1>). Genomic sequences of *B. anthracis* strains from the collection of the Stavropol Anti-Plague Institute have been deposited in the “National Interactive Catalog of Pathogenic Microorganisms and Biotoxins” (State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology).

Markers were searched with the help of an algorithm (Pipeline) consisting of pairwise alignment of complete genomes to a reference sequence using the Mauve program and subsequently, with the help of the author’s scripts in the Python language, extraction of genetic variants from the alignments, merging and their analysis.

Marker verification and determination of marker lengths were performed in the BLASTn program using flanking sequences or specific primers.

In order to compare phylogenetic groups with genetic markers, a phylogenetic tree was constructed on the basis of core SNP alignment using the Parsnp program from the Harvest suite package with the reference genome of *B. anthracis* Ames Ancestor (GCF\_000008445.1). Positions with the unknown N nucleotide were removed from the core SNPs. The SNPs from the VCF file were then converted to a FASTA file. The phylogenetic tree was constructed in the MEGA XI program using the maximum likelihood method with the Tamura-Nei substitution model [18].

Comparison of the lengths of genetic variants of markers with phylogenetic dendrogram and data visualization were performed in R language environment with ggtree and ggplot2 libraries.

Primers were designed using the Primer-BLAST program and synthesized at the Stavropol Plague Institute.

Sample preparation of *B. anthracis* cultures was carried out according to MG 1.3.2569-09 "Organization of laboratories using nucleic acid amplification methods when working with material containing microorganisms of pathogenicity groups I-IV". DNA extraction of *B. anthracis* was performed using the DNA-Sorb-B kit (ILC).

A representative phylogenetic sample of sequenced strains was used for verification of data obtained by PCR with electrophoretic detection. PCR was performed using the ScreenMix-HS kit (Eurogen). The amount of primers in the reaction was equal to 0.3 μM. The following thermocycling mode was used: the first stage (activation) — 95°C, 5 min — 1 cycle, the second

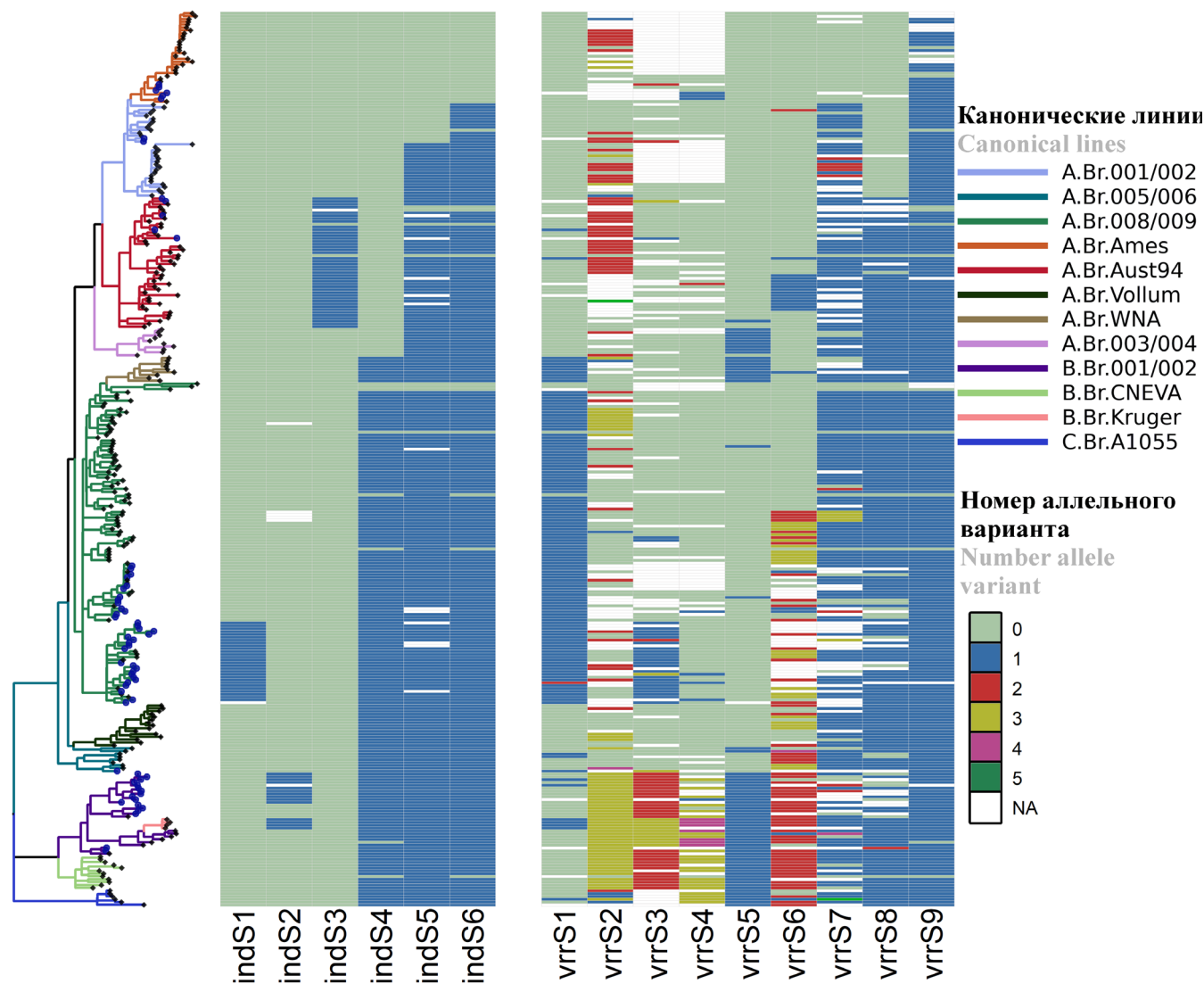
stage — denaturation 95°C, 20 s, annealing 60°C, 20 s, elongation 72°C, 60 s — 40 cycles, the third stage (final elongation) — 72°C, 5 min — 1 cycle. Electrophoresis was performed in 2% agarose gel using a 100 bp molecular weight marker (SibEnzyme).

Clustering of data obtained from PCR results with electrophoretic detection was performed using the single (Nearest Point Algorithm) method in Python with the scipy library.

## Results and discussion

The study included two main stages. The first stage involved the search and description of marker loci, and the second stage involved experimental confirmation and validation of the typing technique using the found markers.

The algorithm resulted in the following genomic variations: SNP — 25,664, SNR — 14,387, VNTR — 693, INDEL — 14,667.



**Fig. 1.** Comparison of the phylogenetic tree and selected markers *B. anthracis* (some strains with repeated marker patterns were removed).

The search for markers among all found variations was performed stepwise with filtering according to a number of criteria. The difference in the size of variants of variable loci should be at least 15 bp. We selected mainly such loci with at least one genetic variant in the set of *B. anthracis* strains from the collection of pathogenic microorganisms of the Stavropol Anti-Plague Institute that was different from the variants of other strains. Variable loci already described were excluded. Using the criteria, 537 variable regions were found.

Following this, the frequency of allelic variants of loci of strains in certain genetic lineages was investigated by comparing the lengths of genetic variants of markers with the phylogenetic dendrogram based on SNPs of the bovine genome (Fig. 1). Most of the variant loci were found in only 1 strain or a minimal number of strains. A significant group consisted of variants sharing the major genetic lineages A, B, and C, including the previously found INDEL indE1 of 38 bp in length. [19], which is logical since these are the most evolutionarily distant genetic lineages.

Fifty-six VNTR and INDEL loci were selected (Table 1). The most phylogenetically significant and optimal for electrophoresis were selected from them. Thus, as a result, 9 VNTR markers and 6 INDEL markers most suitable for genotyping were selected (Fig. 1). The peculiarity of the INDELS found lies in the repeats flanking the INDELS, with one of the repeats being included in the deletion and the other not. For this reason, we can assume the formation of a complex structure between DNA strands during replication, which may cause the polymerase complex to mistakenly double the DNA strand by excising part of the sequence. In this case, reverse INDEL insertion is impossible, which likely reduces the effects of homoplasmy.

The indels indS1 (*FAD-binding oxidore-*

*ductase gene*), indS2 (hypothetical protein gene *WP\_000829051.1*), and indS6 (cell surface protein gene) localized in the protein-coding genes are genomic variations without a shift of reading frame. IndS4 localizes in the region between the *GBAA\_RS02140* (ABC transporter ATP-binding protein) and *GBAA\_RS02145* (ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein) genes. IndS5 localizes in the region between the genes *GBAA\_RS03470* (hypothetical protein) and *GBAA\_RS03475* (alanine:cation symporter family protein). Indel indS3 shifts the reading frame of the gene encoding the SPFH/Band 7/PHB domain protein.

The indel indS1 genetic variant with deletion is characteristic of the A.Br.008/009 (Tsiankovskii) cluster. The indel indS2 is unusual in that there are 3 genetic variants of this locus: an insertion and 2 deletion variants. The difference between the two deletions is a shift of 9 nucleotide pairs. One variant is characteristic of the Siberia and Europe canSNP subgroups of the B.Br.001/002 group, the other is characteristic of strains of the B.Br.Kruger group. The indS3 locus variant with deletion is found in strains of the A.Br.Aust94 group, except for strain 9080-G isolated in Georgia and Kanchipuram strain from India. Variants indS4, indS5, indS6 with deletion are found in A.Br.004, A.Br.001 and A.Br.Ames clusters, respectively.

The number of allelic variants of the selected VNTR markers varies from 2 to 6 with repeat lengths ranging from 30 bp to 196 bp (Fig. 1). The *vrrS1* locus has a 425-bp variant found in A.Br.008/009 and A.Br.WNA, as well as one unique 337-bp variant specific to strain 228/269. Genetic variants of the *vrrS2* locus are found in the A.Br.008/009 and A.Br.Aust94 groups. Two VNTR markers, *vrrrS3* and *vrrS4*, were found on the pXO2 plasmid. Separate genetic variants of *vrrS3* are found in

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

Marker	Coordinates of the locus in the genome according to the Ames Ancestor reference strain (GCF_000008445.1)	Replicon	The number of the allele variant (the length of the genetic variant, bp)
indS1	1276500–1276764	Chromosome	1 (265, 266), 2 (241)
indS2	1904893–1905267	Chromosome	1 (373–375), 2 (312)
indS3	1944246–1944531	Chromosome	1 (286), 2 (253)
indS4	402388–402715	Chromosome	1 (328), 2 (423–424)
indS5	655408–655662	Chromosome	1 (255), 2 (272, 284–285)
indS6	4691499–4691775	Chromosome	1 (277), 2 (388–389)
<i>vrrS1</i>	1721221–1721733	Chromosome	1 (513), 2 (425)
<i>vrrS2</i>	4489063–4489484	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	Chromosome	1 (172), 2 (142)
<i>vrrS6</i>	1092722–1092959	Chromosome	1 (238), 2 (198), 3 (318–319), 4 (398), 5 (278)
<i>vrrS7</i>	5088417–5088723	Chromosome	1 (306–307), 2 (190), 3 (229), 4 (385), 5 (346), 6 (268) (385)

End of the Table 1

Marker	Coordinates of the locus in the genome according to the Ames Ancestor reference strain (GCF_000008445.1)	Replicon	The number of the allele variant (the length of the genetic variant, bp)
vrrS8	5031546–5031803	Chromosome	1 (258, 263–265), 2 (354, 359–366)
vrrS9	3742896–3743541	Chromosome	1 (646), 2 (450)
indNS1	130607–131099	pXO1	1 (454, 456), 2 (494–495)
indNS2	596340–596832	Chromosome	1 (352), 2 (492–493)
indNS3	122138–122690	pXO1	1 (551–555), 2 (485, 487)
indNS4	77192–77540	pXO1	1 (330), 2 (349), 3 (619)
indNS5	482012–482157	Chromosome	1 (146, 149), 2 (504)
indNS6	385564–385837	Chromosome	1 (271–276), 2 (305–308)
indNS7	1372136–1372298	Chromosome	1 (163), 2 (181)
indNS8	2559203–2559485	Chromosome	1 (282–284), 2 (335–336)
indNS9	3855034–3855252	Chromosome	1 (219), 2 (231), 3 (239–241)
indNS10	4303573–4303825	Chromosome	1 (253), 2 (310–311)
indNS11	4965875–4966088	Chromosome	1 (214), 2 (321)
indNS12	1209302–1209701	Chromosome	1 (253), 2 (399–401)
indNS13	2728738–2729257	Chromosome	1 (229), 2 (519–520)
indNS14	486258–486638	Chromosome	1 (285), 2 (381)
indNS15	1287411–1287701	Chromosome	1 (201), 2 (291)
indNS16	910496–910796	Chromosome	1 (301), 2 (490, 491)
indNS17	2533966–2534193	Chromosome	1 (228), 2 (634–636)
indNS18	2593388–2593616	Chromosome	1 (228–230), 2 (283)
indNS19	3352013–3354229	Chromosome	1 (193, 194), 2 (2124), 3 (2207, 2215–2218, 2223)
indNS20	3829833–3830053	Chromosome	1 (220–221), 2 (251)
indNS21	4811428–4811664	Chromosome	1 (236–237), 2 (600, 602)
indNS22	29253–29436	pXO1	1 (184), 2 (269)
indNS24	1146673–1147101	Chromosome	1 (256), 2 (270–272), 3 (427–430)
indNS25	2224848–2225376	Chromosome	1 (270), 2 (418), 3 (529–530, 537)
indNS26	2687438–2687847	Chromosome	1 (240–241), 2 (410, 408–410), 3 (429) 4 (580)
indNS27	3304833–3305473	pXO1	1 (245, 257), 2 (640–641)
vrrNS1	226241–226786	Chromosome	1 (545–547), 2 (694, 697–699), 3 (845–847), 4 (997–998), 5 (1146), 6 (1296–1298)
vrrNS2	1333990–1334961	Chromosome	1 (343), 2 (554, 552), 3 (700), 4 (758, 762–763), 5 (779), 6 (971–974), 7 (1182–1183), 8 (1393)
vrrNS3	2014690–2015095	Chromosome	1 (277), 2 (364), 3 (406, 409), 4 (535)
vrrNS4	4233686–4234066	Chromosome	1 (237), 2 (273, 279), 3 (306, 309, 322), 4 (381), 5 (417), 6 (345)
vrrNS5	4351696–4351908	Chromosome	1 (213), 2 (231)
vrrNS6	4598742–4598948	Chromosome	1 (195, 207), 2 (171, 183)
vrrNS7	811781–812154	Chromosome	1 (284), 2 (302), 3 (320), 4 (374), 5 (428), 6 (482)
vrrNS8	1395847–1396186	Chromosome	1 (340), 2 (385)
vrrNS9	1238148–1238579	Chromosome	1 (361, 366), 2 (398), 3 (430–433), 4 (465), 5 (498)
vrrNS10	2264930–2265251	Chromosome	1 (244), 2 (283), 3 (322), 4 (361), 5 (439), 6 (517)
vrrNS11	4352078–4352327	Chromosome	1 (220), 2 (235), 3 (250, 251), 4 (264–266), 5 (295), 6 (310)
vrrNS12	4927425–4927645	Chromosome	1 (181), 2 (221)
vrrNS13	4769700–4770199	Chromosome	1 (499–501), 2 (352–353)
vrrNS15	1151194–1151463	Chromosome	1 (148), 2 (269–270), 3 (291), 4 (392–393, 396), 5 (514, 520)
vrrNS16	2006677–2007157	Chromosome	1 (481), 2 (433, 435–436), 3 (526), 4 (301), 5 (345–347), 6 (390–391), 7 (255–257)



A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.KrugerB and main lineage B, respectively. The *vrS4* locus separates the strains into lineages A and B. The 142 bp allelic variant *vrS5* is found simultaneously in strains of lineage B, A.Br.WNA and A.Br.003/004 groups. The *vrS6* variants are characteristic of part of the strains of the A.Br.008/009 group, the A.Br.004 cluster and lineage B. The *vrS7* 307 bp genetic variant is specific for the A.Br.Ames group. The 258 bp *vrS8* variant is specific to the A.Br.Ames and A.Br.001/002 groups. The 646 bp *vrS9* genetic variant is specific for A.Br.Ames strains isolated in North America.

Variable loci can be grouped according to their belonging to certain genetic clusters. For example, variants of indels *indS3*, *indNS27*, and VNTR - *vrNS7* have similar belonging to the A.Br.Aust94 group. Indels *indS4* and *indNS11* are characteristic of A.Br.004, *indNS17* and *vrS9* are characteristic of A.Br.Ames strains isolated in North America. Variants *indNS5*, *indNS9*, *indNS10* are found in strains of the A.Br.Ames and A.Br.001/002 groups.

For the major lineage B, the characteristic loci are *indNS1*, *indNS12*, *indNS19*, *indNS2*, *indNS3*, *indNS13*, *indNS14*, and *vrNS12*. Characteristic loci for both lineages B and C are *indNS18*, *indNS21*, *indNS4*, *indNS6*, *indNS7* and *indNS8*.

Some of the unselected markers could also be used for typing. For example, *vrNS1* has high variability but a long repeat of 150 bp and a large length difference between the minimum and maximum genetic variant, which is difficult for electrophoretic detection by PCR. The VNTR of *vrNS15* is variable within the A.Br.008/009 group. The tandem repeats *vrNS16*, *vrNS2*, *vrNS4* do not have strict specificity.

The primers were selected for the found markers

(Table 2) and a PCR protocol with detection of the results by agarose gel electrophoresis was developed (Fig. 2, Fig. 3). The selected markers had a nucleotide sequence length sufficient for reliable determination of genetic variants of loci (Table 3).

Some strains lack the *pXO2* plasmid, and accordingly, they also lack the *vrS3* and *vrS4* loci.

As a result of clustering based on the INDEL typing, strains were divided into 6 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 including representatives of several genetic groups: A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 and B.Br.001/002. The cluster is singled out as a separate group because no specific INDEL markers have been identified for the strains of these lineages (Fig. 4).

As a result of clustering based on VNTR-typing, strains were divided into 9 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 (Fig. 4). Strain 228/269 is a member of the A.Br.008/009 (Tsiankovskii) group.

The discriminatory power determined using the Hanter–Gaston diversity index [20] was 0.7 for canSNP typing, and 0.79 and 0.84 for typing based on the analysis of new VNTR and INDEL markers, respectively.

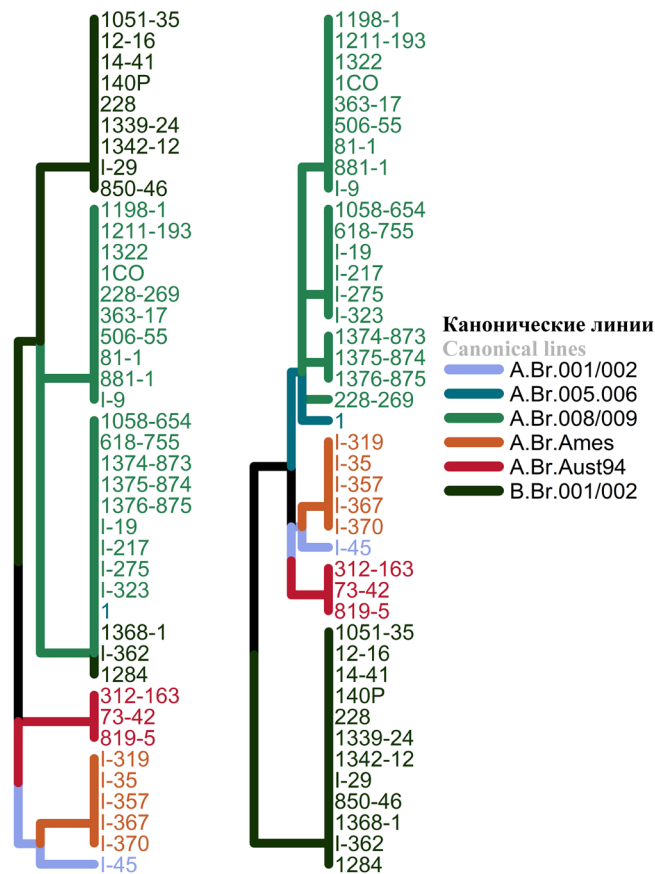
## Conclusion

Thus, as a result of genome analysis of 388 *B. anthracis* strains, variable regions were identified and characterized. New VNTR- and INDEL-markers were found and their binding to clusters of global phylogeny was studied. The developed protocol for marker iden-

**Table 2.** Primers to VNTR and INDEL loci *B. anthracis*

Name	Forward primer	Reverse prime
<i>indS1</i>	TATTGGGCAGCAGCATTTGG	ATGAGTTGTACGGGACGCAA
<i>indS2</i>	TGGAGGGGTTGTCAAGCG	GCGTAACTCGGAGACCATGTA
<i>indS3</i>	AGCAACAGAAAAATGGGGCG	AATCGCTCTTGTCCCTT
<i>indS4</i>	AGAAGGAACAAAAGGAAAAGTAGAG	CAACATGCTCGCCCTCAAT
<i>indS5</i>	GGTCTATACGGCACACTCCA	GCTTCCAATATCCCCCTCC
<i>indS6</i>	AGCCCCTTCTTCGGGTGAT	CGATGAAGATGTAAGACAGCCC
<i>vrS1</i>	TCGTCCTGGAGCATCTTCA	CCAAATCGCCCCTAGACCAA
<i>vrS2</i>	GTTGTTTCATACGTCTATCCCCTC	GTCCTTTTGGACAGCCTCTCTT
<i>vrS3</i>	ACTGTAGTTGTCCCTACCCTT	AGAAGTACAGGTGGGACAGGA
<i>vrS4</i>	TTTCCTTGGCATGCTTCAGT	TGCTGGTATAGAGCCATCTGC
<i>vrS5</i>	AGCAATGTTAATCACCATCAAGT	GTACGCTTTAGTCGGAGACGG
<i>vrS6</i>	AGGAAGCAGTTAGCGTTGT	GCGCTATGTGGCTCTTTTC
<i>vrS7</i>	AGGAACACTGGTTCAGCCTAT	AGCAGGATCGCTTGCTAGAT
<i>vrS8</i>	CTGCAATTGCCTTCGCCTT	GCGAAAAAGAGAAAGCGCTAC
<i>vrS9</i>	ATGAAGGTGTGACATGCCGT	GTGAAGCTGTAATTGTGGCGT





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

tification by PCR with electrophoretic visualization of the results allows reliable determination of allelic variants of markers. The found 9 VNTR markers and 6 INDEL markers allow to divide *B. anthracis* strains into 6 and 9 genetic groups when typing with separate analysis of these markers and into 10 groups when analyzing them together. The genotyping technique based on the analysis of new VNTR- and INDEL-markers is recommended to be used jointly or separately as an addition to the existing genotyping schemes. The use of the developed methodology for the identification of variable VNTR- and INDEL-loci allows reliable determination of the phylogenetic position of *B. anthracis* strains and is promising for use in the epidemiologic investigation of anthrax outbreaks.

#### 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>
- 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., Водопьянов А.С., Писанов Р.В. INDEL-типирование — новый метод дифференциации штаммов *Helicobacter pylori*. *Бактериология.* 2020;5(1):8–13. Sorokin V.M., Vodopyanov 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>
- 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>
- 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/zhlhkh>
- 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>

#### Information about the authors

*Grigoriy A. Pechkovskii*<sup>✉</sup> — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, [grigoriy.pechkovskii@gmail.com](mailto:grigoriy.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

#### Информация об авторах

*Печковский Григорий Александрович*<sup>✉</sup> — м.н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, [grigoriy.pechkovskii@gmail.com](mailto:grigoriy.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>

*Аksenova Людмила Юрьевна* — к.м.н., с.н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

*Сemenova 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. межкандидатской 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; *Аksenova Л.Ю., Semenova 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

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.<sup>✉</sup>, 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<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) и его изогенные производные *Y. pestis* KM216 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>-</sup>, pYP<sup>+</sup>), *Y. pestis* KM217 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>-</sup>), *Y. pestis* KM218 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>-</sup>, pYP<sup>-</sup>). 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 плазида pYV, взятых в дозе  $5 \times 10^8$  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 ( $319 \pm 8$  и  $312 \pm 7$  нм против  $70 \pm 6$  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<sup>✉</sup>, 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<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) and its isogenic derivatives *Y. pestis* KM216 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>-</sup>, pYP<sup>-</sup>), *Y. pestis* KM217 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>-</sup>), *Y. pestis* KM218 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>-</sup>, pYP<sup>-</sup>) 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  $5 \times 10^8$  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 ( $319 \pm 8$  nm and  $312 \pm 7$  nm versus  $70 \pm 6$  nm in the control group), Young's modulus ( $125.73 \pm 4.48$  kPa and  $113.8 \pm 5.41$  kPa versus  $53.03 \pm 1.47$  kPa in the control group). By the 21<sup>st</sup> 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<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> [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<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) и его изогенными производными *Y. pestis* KM 216 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>-</sup>, pYP<sup>+</sup>), *Y. pestis* KM 217 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>-</sup>), *Y. pestis* KM 218 (pYT<sup>-</sup>, pYV<sup>-</sup>, pYP<sup>-</sup>), 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  $5 \times 10^8$  КОЕ и  $5 \times 10^5$  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 Федерации<sup>1</sup> и международными принципами<sup>2</sup>. 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  $3 \times 10^6$  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  $15 \times 15$  до  $50 \times 50$  мкм<sup>2</sup> 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]:

<sup>1</sup> Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

<sup>2</sup> 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, выводили 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

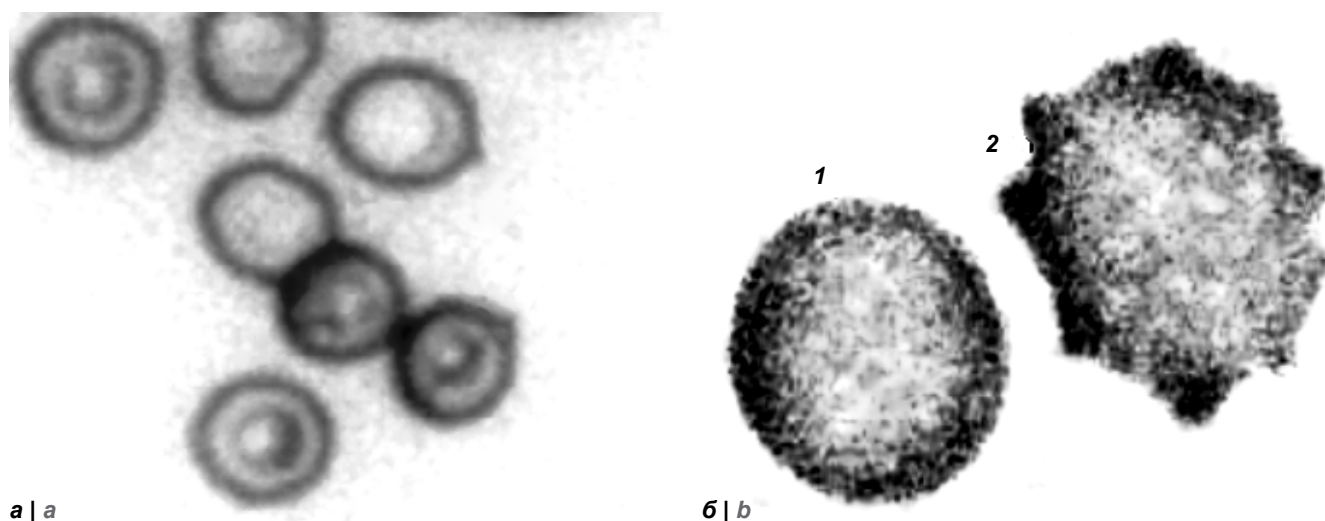
Эритроциты интактных морских свинок при наблюдении в световом микроскопе в стандартном режиме светлого поля представляли собой оптически контрастные объекты округлой формы (рис. 1, а). В ответ на иммунизацию морских свинок штаммами *Y. pestis* в крови происходило изме-

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  $220 \pm 30$  нм, равномерно распределёнными на поверхности клетки (рис. 3, б). На долю ко-



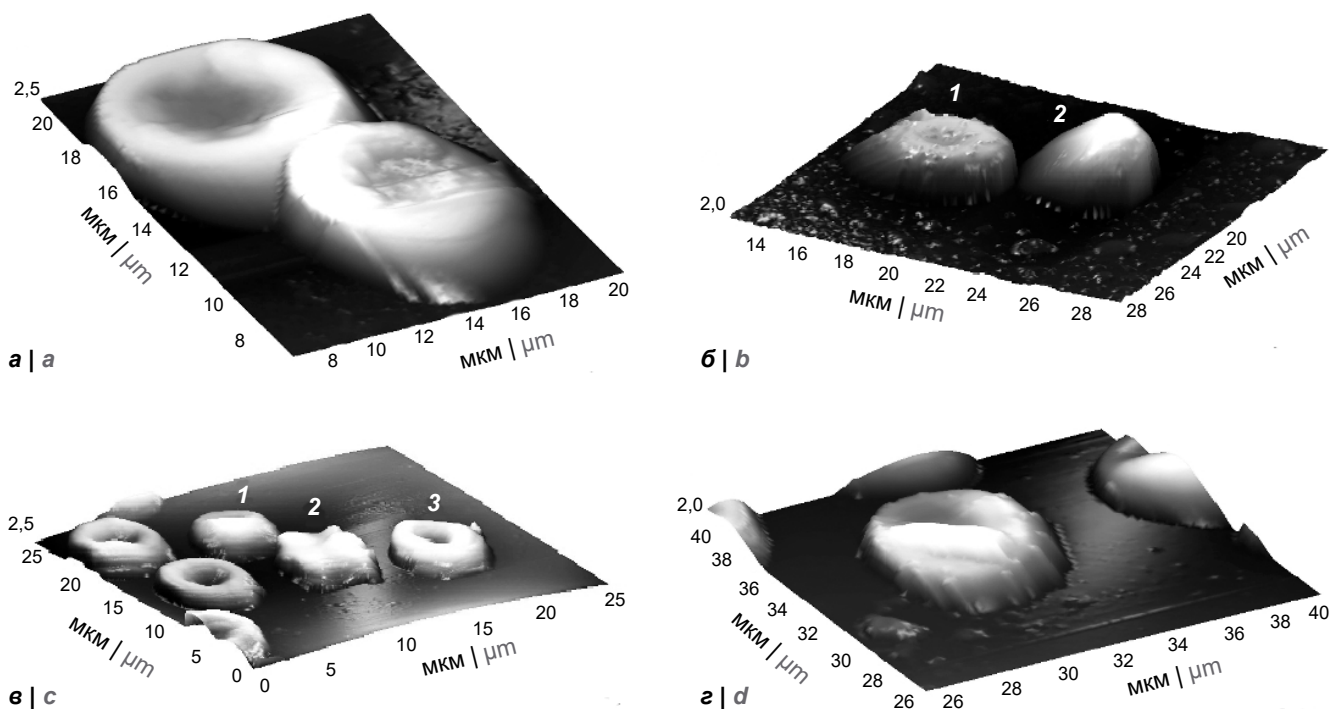
**Рис. 1.** Эритроциты морской свинки (световая микроскопия без окраски).

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,  $15 \times 15 \text{ мкм}^2$ .

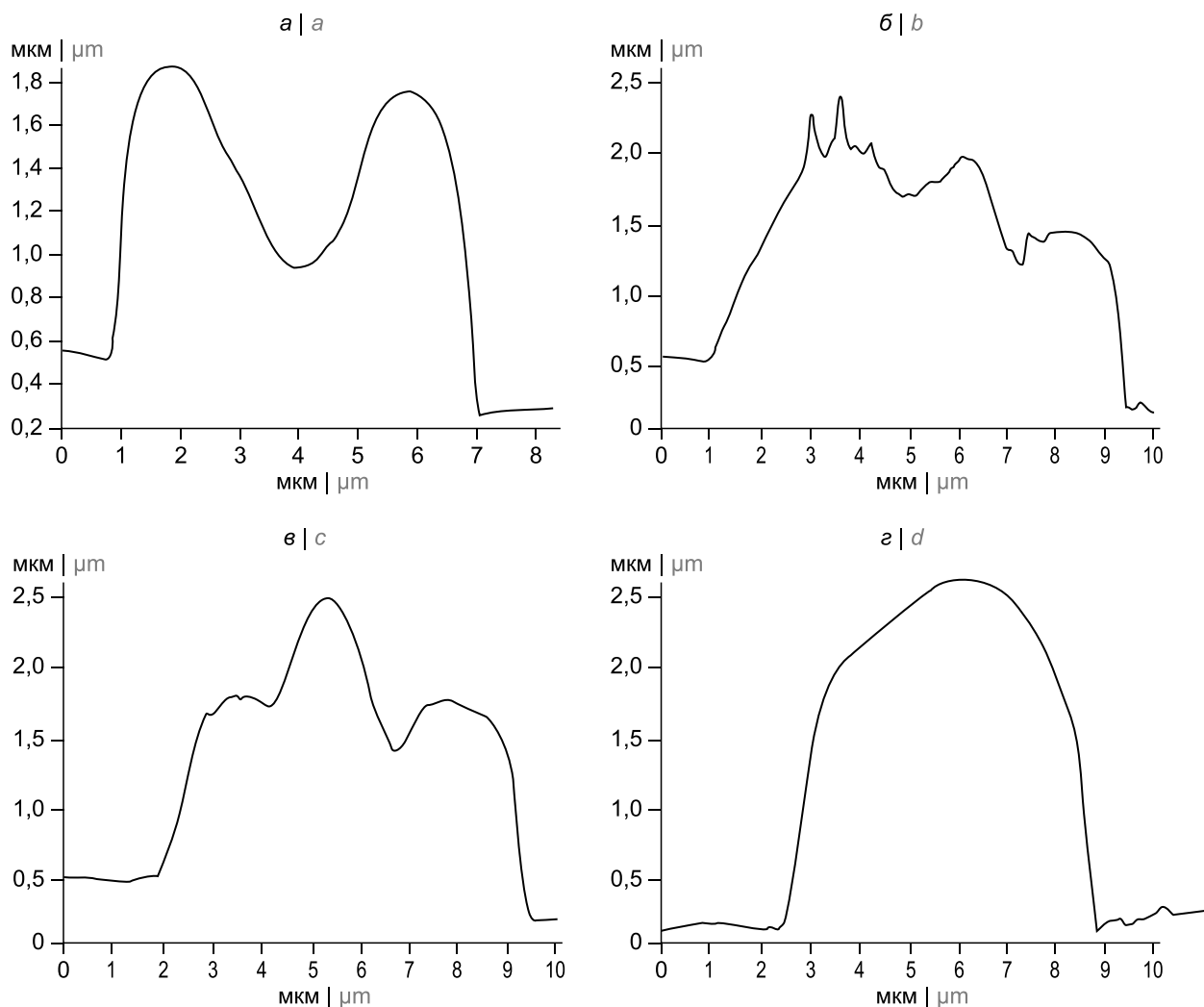
**Fig. 2.** 3D AFM images of erythrocytes from a guinea pig immunized with *Y. pestis* EV NIIЭГ.

**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 <sup>st</sup> day	3-и сутки   3 <sup>rd</sup> day	21-е сутки   21 <sup>st</sup> day
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	1	$5 \times 10^5$	$28,71 \pm 6,24^*$	$28,09 \pm 3,83^{**}$	$11,43 \pm 1,47^{*o}$
	2	$5 \times 10^8$	$37,5 \pm 5,07^*$	$43,67 \pm 3,63^{**}$	$15,15 \pm 2,02^{*3}$
<i>Y. pestis</i> KM 216	3	$5 \times 10^5$	$13,57 \pm 4,13^*$	$17,66 \pm 3,48^*$	$8,0 \pm 2,12$
	4	$5 \times 10^8$	$18,33 \pm 4,26^*$	$20,77 \pm 4,54^*$	$9,17 \pm 3,29$
<i>Y. pestis</i> KM 217	5	$5 \times 10^5$	$34,45 \pm 5,23^*$	$35,47 \pm 6,85^*$	$10,65 \pm 2,56^{*o}$
	6	$5 \times 10^8$	$36,15 \pm 6,07^*$	$37,83 \pm 7,03^*$	$14,58 \pm 4,84^{*o}$
<i>Y. pestis</i> KM 218	7	$5 \times 10^5$	$11,89 \pm 3,71^*$	$16,71 \pm 2,72^*$	$6,29 \pm 2,87$
	8	$5 \times 10^8$	$16,85 \pm 2,74^*$	$19,65 \pm 3,27^*$	$9,09 \pm 2,3$
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 1<sup>st</sup> 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<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) и *Y. pestis* KM 217 (pYV<sup>+</sup>) в зависимости от дозы во все сроки иммунного ответа. Так, при использовании вышеперечисленных штаммов в высокой дозе ( $5 \times 10^8$  КОЕ) величина Rq в среднем в 1,7 раза превышала ( $p < 0,05$ ) соответствующие величины при низкой дозе ( $5 \times 10^5$  КОЕ). На 21-е сутки зарегистрировано статистически значимое снижение показателя Rq при иммунизации животных штаммами *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>), *Y. pestis* KM 216 (pYP<sup>+</sup>), *Y. pestis* KM 217 (pYV<sup>+</sup>) 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  $5 \times 10^8$  КОЕ по сравнению с 1-ми сутками и контролем ( $p < 0,05$ ). В случае применения штамма *Y. pestis* KM 216 (pYP<sup>+</sup>) в дозе  $5 \times 10^5$  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<sup>+</sup>) (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 <sup>st</sup> day		3-и сутки   3 <sup>rd</sup> day		21-е сутки   21 <sup>st</sup> 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	$5 \times 10^5$	131 ± 7 <sup>#</sup>	95,25 ± 2,86 <sup>#</sup>	137 ± 6 <sup>#</sup>	125,00 ± 3,75 <sup>#°</sup>	111 ± 7 <sup>#°</sup>	61,14 ± 2,46 <sup>#°</sup>
2	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	$5 \times 10^8$	319 ± 8 <sup>#</sup>	125,73 ± 4,48 <sup>#</sup>	183 ± 7 <sup>#°</sup>	142,58 ± 5,98 <sup>#°</sup>	150 ± 8 <sup>#°</sup>	77,92 ± 3,73 <sup>#°</sup>
3	<i>Y. pestis</i> KM 216	$5 \times 10^5$	129 ± 8 <sup>*</sup>	62,28 ± 2,87	179 ± 9 <sup>°</sup>	70,02 ± 2,76 <sup>*</sup>	101 ± 8 <sup>°</sup>	80,27 ± 2,76 <sup>°</sup>
4	<i>Y. pestis</i> KM 216	$5 \times 10^8$	153 ± 9 <sup>*</sup>	72,11 ± 2,16 <sup>*</sup>	203 ± 9 <sup>°</sup>	80,08 ± 3,73 <sup>*</sup>	110 ± 9 <sup>°</sup>	76,98 ± 3,82 <sup>*</sup>
5	<i>Y. pestis</i> KM 217	$5 \times 10^5$	228 ± 7 <sup>#</sup>	101,13 ± 3,04 <sup>*</sup>	201 ± 7 <sup>#°</sup>	76,14 ± 2,28 <sup>°</sup>	88 ± 5 <sup>#°</sup>	80,60 ± 2,42 <sup>°</sup>
6	<i>Y. pestis</i> KM 217	$5 \times 10^8$	312 ± 7 <sup>#</sup>	113,80 ± 5,41 <sup>*</sup>	280 ± 8 <sup>#°</sup>	81,61 ± 2,45 <sup>°</sup>	164 ± 6 <sup>#°</sup>	84,41 ± 2,53 <sup>°</sup>
7	<i>Y. pestis</i> KM 218	$5 \times 10^5$	90 ± 5	65,80 ± 1,98 <sup>*</sup>	101 ± 4 <sup>*</sup>	71,22 ± 2,32 <sup>*</sup>	71 ± 5 <sup>#</sup>	68,52 ± 2,29 <sup>*</sup>
8	<i>Y. pestis</i> KM 218	$5 \times 10^8$	110 ± 10 <sup>*</sup>	74,70 ± 2,24 <sup>*</sup>	111 ± 6 <sup>*</sup>	80,37 ± 2,47 <sup>°</sup>	104 ± 6 <sup>#</sup>	77,55 ± 2,51 <sup>*</sup>

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<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup>/Pgm<sup>-</sup>), 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<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) и его изогенный вариант *Y. pestis* KM 217 (pYV<sup>+</sup>) при применении в высокой дозе ( $5 \times 10^8$  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](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<sup>+</sup> 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 glycoporphins. *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](mailto: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](mailto: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.<sup>1✉</sup>, Егорова М.С.<sup>1</sup>, Ветрова А.Н.<sup>1</sup>, Баловнева М.В.<sup>1</sup>, Попова Ю.В.<sup>1</sup>,  
Теодорович Р.Д.<sup>1</sup>, Мироненко А.А.<sup>2</sup>, Апарин П.Г.<sup>2</sup>, Львов В.Л.<sup>2</sup>,  
Ткаченко Е.А.<sup>1</sup>, Дзагурова Т.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

<sup>2</sup>Государственный 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<sup>1✉</sup>, Maria S. Egorova<sup>1</sup>, Anna N. Vetrova<sup>1</sup>, Maria V. Balovneva<sup>1</sup>, Yulia V. Popova<sup>1</sup>, Rostislav D. Teodorovich<sup>1</sup>, Anna A. Mironenko<sup>2</sup>, Peter G. Aparin<sup>2</sup>, Vyatcheslav L. Lvov<sup>2</sup>, Evgeniy A. Tkachenko<sup>1</sup>, Tamara K. Dzagurova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs (Polio Institute), Moscow, Russia;

<sup>2</sup>National 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 Добрава/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 препаратов: моновакцина с использованием вируса Пуумала «PUUVAX» в 1990 г. [4], двухкомпонентная вакцина «Комби-ГЛПС-Вак» на основе вирусов Пуумала и Добрава/Белград (подтип Куркино) в 2008 г. [5], трёхкомпонентная вакцина «ГЛПС-Вак» на основе вирусов Пуумала, Добрава/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 низкоэндоксичного апирогенного 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 — глюкопиранозиллипид 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 NCT04702178<sup>1</sup> и NCT05209009<sup>2</sup>.

**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/ФОЕ<sub>50</sub>), выявленных в контрольном образце вируса. Каждая проба сыворотки крови трижды исследована в РН/ФОЕ<sub>50</sub>.

#### 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  $30 \pm 6$  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  $20 \pm 6$  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 апиногенный ЛПС, содержащий гомогенные длинные О-полисахаридные домены Ас3-ЛПС *S. sonnei* (ЛПСГ-*S. sonnei*, 50 мкг/дозу);

2) низкоэндогенный апиногенный ЛПС, содержащий смесь коротких и длинных О-полисахаридных доменов Ас3-ЛПС *S. sonnei* (ЛПС-*S. sonnei*, 50 мкг/дозу);

3) гомогенный низкоэндогенный апиногенный 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/дозу<sup>3</sup>) была безвозмездно передана компанией «Seppic» для проведения данных исследований.

<sup>1</sup> A Clinical trial of COVAC-2 in healthy adults.  
URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04702178>

<sup>2</sup> A Clinical trial of COVAC-2 in adults.  
URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05209009>

<sup>3</sup> 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 объём 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  $\leq 4$ ) 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

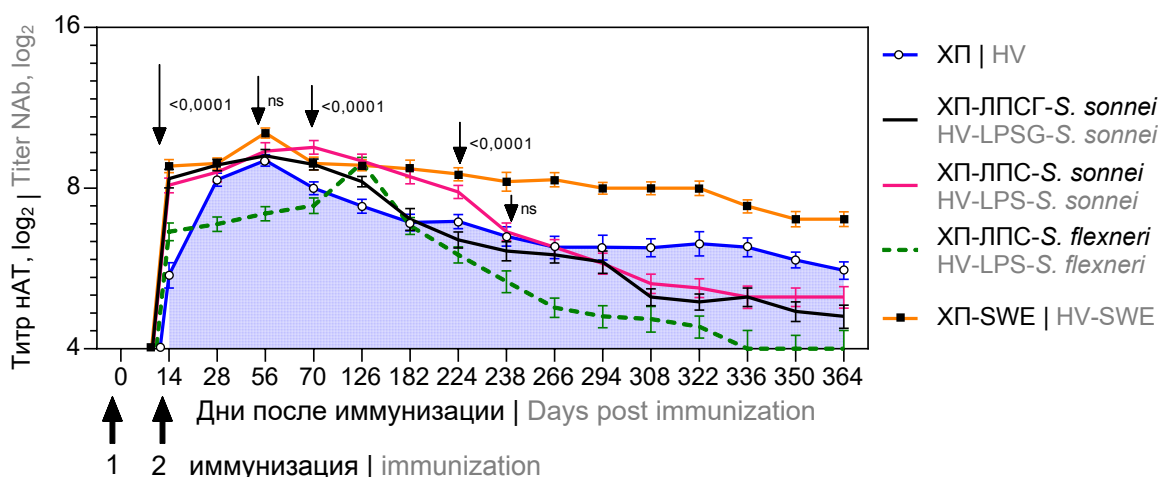
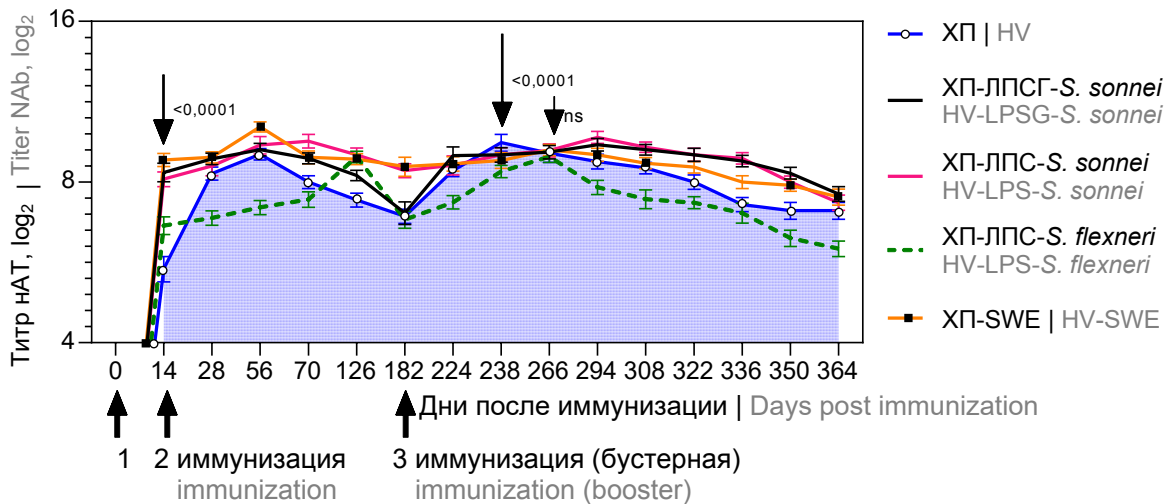


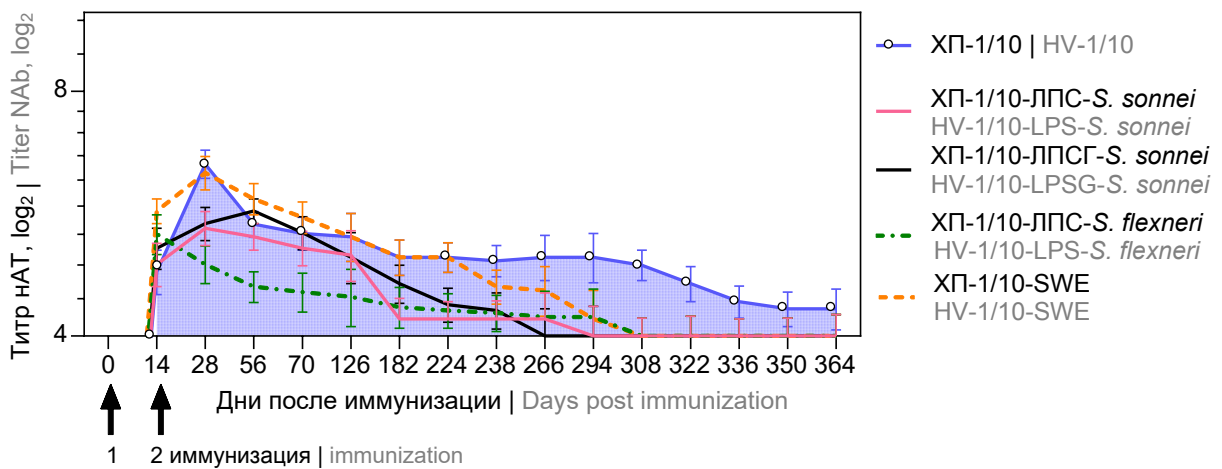
Рис. 1. Кинетика титра нАТ в сыворотках крови морских свинок в ответ на двукратное введение ХП в оптимальной дозе.

Fig. 1. Kinetics of neutralizing antibody titers in guinea pig blood sera in response to two doses of HV administered at optimal dosage.



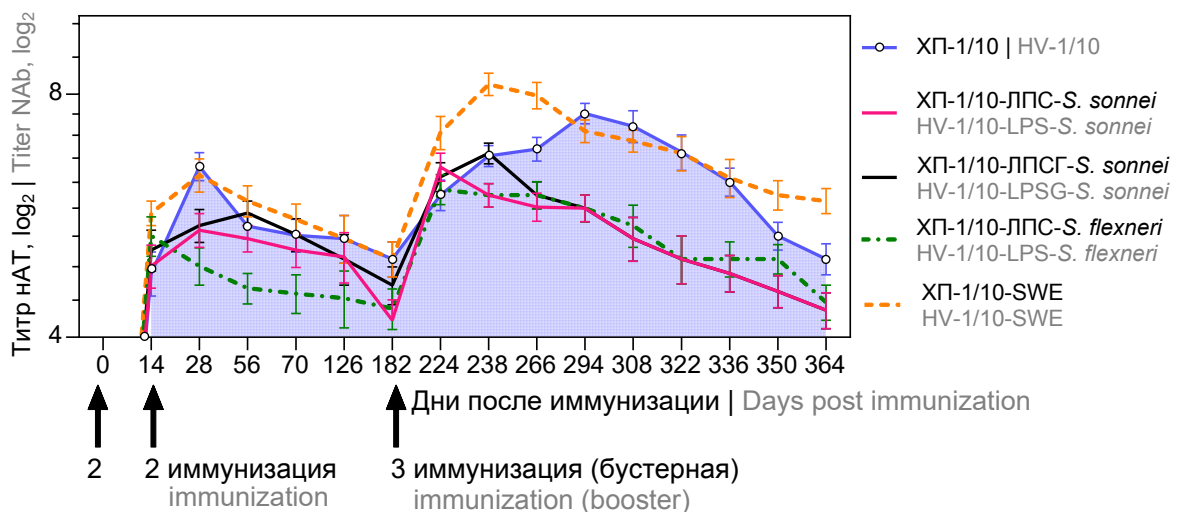
**Рис. 2.** Кинетика титра нАТ в сыворотках крови морских свинок в ответ на трёхкратное введение ХП.

**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 адъювантов 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 адъювантов 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 адъювантом. 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 адъювантами 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 адъювантами 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 адъюванта, 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, иммуноадъювантный эффект ЛПСГ-*S. sonnei* заключается в пролонгировании гу-

морального иммунного ответа, что позволит увеличить интервалы в схеме иммунизации. Безусловно, низкоэндоотоксичные апиригенные Ас3-ЛПС являются многообещающими адъювантами с подтверждённым в клинических исследованиях отсутствием стимуляции продукции провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлекинов-1 $\beta$  и -6), системных и местных эндоотоксичных побочных реакций при парентеральном введении добровольцам в дозе 50 мкг [34]. Данные нашего исследования показали существенный подъём 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 отдалённом 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 подъёму 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 низкоэндоотоксичный 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  $\beta$ -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](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  $\alpha$ -galactosylceramide-CD1d complex to recognize  $\beta$ -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](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](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  $\beta$ -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](mailto: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](mailto: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



# Hospital environment microbiome

Elena B. Brusina<sup>✉</sup>

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>

# Микробиом больничной среды

Брусина Е.Б.<sup>✉</sup>

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 ком-

понтенты 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 иммунобиологии. 2024;101(3):393–398. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-520>  
EDN: <https://www.elibrary.ru/lrlfrw>

## Introduction

Healthcare-associated infections (HAIs) accompany all healthcare settings in the world without exception and significantly affect the quality of care. Their frequency varies considerably and, according to various estimates, is 130–203 episodes per 1000 patient-days<sup>1</sup>. In severe forms of HAIs, mortality can reach 30% [1] and increase by another 20% within a year after sepsis [2]. The cost of patient treatment in case of complications of HAIs increases by 2.7 times [3].

The frequency of HAIs is a variable parameter and depends on many variables: the capacity of a medical organization, its architecture, equipment, medical technologies used, the type of departments, the prevailing pathology and age of patients, their comorbidity, duration of hospitalization, the system of prevention and control of HAIs and others. However, even with the marked heterogeneity of indicators and determinants influencing them, it is obvious that HAIs continue to be a global problem with a heavy burden in the form of ethical, medical, financial and social components [4].

A significant proportion of the events that determine the epidemic process of HAIs occur in the hospital environment. The hospital environment is a complex, dynamic, unique chemical and physical habitat characterized by a high diversity of microorganisms and special conditions for their selection and growth. Its uniqueness is determined by the relative limited space within which hospital microorganisms circulate in the population of weakened by the main disease, often immunodeficient patients; the combination of natural and artificial pathways and factors of microbial transmission; and the constant selective pressure of antimicrobial agents [5].

Compared to public buildings, multi-storey and private houses, the hospital environment is subjected to aggressive exposure to a variety of chemicals (disinfectants, antibiotics, drugs), which leads to the dominance of human-associated bacteria with a higher component of pathogenic and opportunistic microorganisms [6].

To date, it has been established that low (less than 0.4) biodiversity coefficient and virulence are pathognomonic features of hospital strain populations. Selection of a hospital strain (clone) is the result of complex interpopulation interactions, adaptation of a certain microorganism to specific hospital conditions, in the process of which it acquires properties that significantly increase its competitive advantages. The primary formation of hospital strains (clones) occurs in intensive care units. It has been established that a limited spectrum of bacteria has epidemic potential, necessary and sufficient for epidemic spread in the hospital environment and colonization of the main ecological niches [5, 7, 8].

The evolution of etiologic and clinical forms of HAIs is largely dependent on the level of development of medicine and its technologies. Historically, it has traveled a centuries-old path from plague and cholera in the first hospice houses to modern HAIs caused by ESKAPE pathogens [9]. Understanding the ecology of this complex community is extremely important for the effective control of HAIs, as these processes are the basis for the selection of hospital strains that cause at least 60% of HAIs.

**The aim** of the review is to briefly characterize the biodiversity and structure of the hospital environment microbiome on the basis of molecular genetic research methods.

At the current level of knowledge, the hospital environment can be considered as a superorganism with its own microbiome [10]. The type of persistent microbiome is particularly important because it directly correlates with the risk of HAIs [11].

<sup>1</sup> 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>

The concept of microbiome was first formulated in 1988 by J.M. Whipps et al. [12]. The microbiome is defined as a characteristic microbial community occupying a well-defined habitat with distinct physical and chemical properties. Microbiome not only refers to the microorganisms involved, but also covers the sphere of their activities, which leads to the formation of certain ecological niches. The microbiome, which forms a dynamic and interactive microecosystem subject to changes in time and space, is integrated into macroecosystems including eukaryotic hosts and here is crucial to their functioning and health [13].

Little is known about how the microbiome of a medical organization is formed and what factors influence its evolution [14].

It is well established that, compared to the microbiome of urban infrastructure facilities, the microbial diversity of the hospital environment is significantly lower [15].

Until a certain time, studies of the microbiota of the hospital environment for the purposes of epidemiologic diagnostics of HAIs and their control were based on culture methods. However, numerous studies have shown the random nature of the results obtained with this approach and significant limitations, and the approach itself has been figuratively characterized as a search for a needle in a haystack. However, these methods certainly provide an opportunity to detect indicator bacteria. Using these methods, the spectrum of isolated microorganisms is limited to those that are able to grow on the selected culture media, which does not effectively characterize the microbial diversity of abiotic hospital surfaces [16].

To monitor microbial communities in hospitals, 16S rRNA sequencing technology has been used in recent decades [17, 18].

Technological advances in next-generation sequencing and metagenomics have transformed the ability to study microbial diversity in the hospital environment, as evidenced by the explosive growth of microbial ecology research [19]. There is an unprecedented opportunity for rapid global studies of microorganisms and their taxonomic and functional annotation, which is particularly important for surveillance of microorganisms, including those acquiring antimicrobial resistance [20, 21].

Together with new molecular genetic technologies for studying the microbiome, a broader range of microbial biodiversity characterization has become possible. There are more than 40 different biodiversity indices widely used in biology, some of which are suitable for characterizing the biodiversity of the microbiomes of the hospital environment, patients and medical staff. The assessment of alpha diversity is based on species richness (number of species per unit area) and the even distribution of species in terms of their abundance in the community. Dominant, associated and rare species (relative abundance of less than 1%) are assessed. Beta-diversity characterizes the variability of alpha-diver-

sity indices in space – along gradients of environmental factors or during the transition from one community type to another. It is assessed through similarity and heterogeneity indices. The most commonly used indices to characterize biodiversity are Shannon, Simpson, Chao1, Bray–Curtis, Sørensen–Dyce and others. They reflect the complexity of microbial community structure and the degree of prevalence of certain bacteria [22].

Multioomic technologies including meta-transcriptomic, meta-proteomic and metabolomic approaches provide detailed information on microbial activity in the environment. A stable core of the hospital microbiome was found to exist, in which the vast majority of microorganisms are essential for the functioning of the hospital ecosystem and are not among the microorganisms that cause infectious process in humans. The complex communities they form are represented by a large number of taxa in which species interactions and communication are crucial for population dynamics and functional activity [23].

Studies of the microbiome of the hospital environment during the period when the buildings were not yet operational confirmed the presence of this rather diverse and stable microbial community, which was subsequently joined by microorganisms typical of human skin when the clinic started operating. Over time, the biodiversity decreased significantly [24].

Because of the poor understanding of the microbiome of the hospital environment by molecular genetic technologies, there is no consensus on the degree of microbial diversity in different healthcare settings. Few studies have focused on adult and pediatric intensive care units [25, 26]. K.M. Hewitt et al. found that each surface from which samples were taken in neonatal intensive care units was populated by tens to hundreds of bacterial genera, with an average of about 100 bacterial genera on the surface [27]. It was found that a significant ( $W = 110$ ;  $p = 1.3 \times 10^{-7}$ ) decrease in microbial diversity on the surfaces by 50% was accompanied by a significant ( $W = 202.5$ ;  $p = 0.01$ ) increase (by 20%) in the proportion of resistant bacterial strains [10].

M.M. Mustapha et al., using comparative genomics methods, identified a huge diversity of bacterial pathogens. They identified bacteria belonging to 97 different species that encompassed 14 different species groups. Furthermore, 23 species that had not been previously described were identified, including potentially new species of *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Stenotrophomonas*. A total of 41 (1.4%) isolates belonged to these potentially novel species [28]. However, pronounced microbial diversity was not only detected in potentially pathogenic bacterial species inhabiting the surfaces of the hospital environment. K. Li et al. showed using 16S rRNA gene sequencing that *Proteobacteria* and *Firmicutes* were the most important types in two intensive care units in China (70.55 and 15.58%

of all samples, respectively) [29]. R. Dai et al. investigated the hospital microbiome during the COVID-19 pandemic and also found *Firmicutes* (51.6%), *Bacteroidetes* (25%), and *Proteobacteria* (13.6%) to be predominant, while *Ascomycota* and *Basidiomycota* were the dominant fungi (39.4 and 14.2%, respectively) [30]. It is also worth noting that *Propionibacterium* were not found among the dominant ones as found in previous studies [29, 31].

Significant microbial diversity was also demonstrated by our study of dust particles from hospital ventilation grids [32].

A study by P.H. Rampelotto et al. researched the complex picture of interrelationships between bacterial taxa coexisting in the hospital environment using network analysis [18]. The model of network analysis in conditions of deep uncertainty allows to consider different scenarios of situation development. The centrality index identifies the key elements that play a major role in the system. Contrary to previous studies [11], the hospital microbiome has been shown to be homogeneous, with a homogeneous structure in which a few taxa dominate and the remaining components of the microbial network have low connectivity, forming a clustered topology [18]. These structural properties offer opportunities to understand which microorganisms are most important for maintaining the structure and interactions of microbial communities in hospital settings. A keystone species is a taxon whose importance in maintaining community structure is relatively higher than others and its identification is of paramount importance [33]. To date, limited research has been conducted on microbial competition events in a spatial and multiplexed manner, partly due to the lack of available tools.

P.H. Rampelotto et al. showed that the strategy of identifying mutualistic and competitive intermicrobial relationships can be used as a theoretical framework to identify potentially strong negative correlations between pathogens and other species, to determine how one species inhibits the growth of another, and to establish which components are involved in such interactions [18]. As a proof of concept, using *in vitro* co-culture, D.J. Gonzalez et al. demonstrated that *Bacillus subtilis*, which is almost ubiquitous in nature, is able to inhibit the growth of an epidemic isolate of *Staphylococcus aureus* and has the ability to specifically release a molecule with antimicrobial and metabolism-altering properties [34].

Without regular inoculation, human-associated bacteria do not persist in high relative numbers on hospital environmental surfaces. These bacteria, adapted to exist on the skin of their human host, may be displaced by resistant environmental associated species [14]. Some ecological species (e.g., *Bacillus spp.*) are able to survive in nutrient-poor environments through behaviors such as direct antagonism, competition for limited resources and/or spore formation [35–37].

M.M. Mustapha et al. found that *Clostridium difficile* had the lowest rate of evolution, vancomycin-resistant Enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* had intermediate rates, and *Pseudomonas aeruginosa* had the highest rates. Rates overall varied nearly 100-fold among the species studied, ranging from 0.4 single polymorphisms per genome per year for *C. difficile* to 28.80 for *Pseudomonas aeruginosa*. These data partly explain the difference in the rate of formation of hospital strains (clones) in different bacterial species [28].

The use of next-generation sequencing-based methods allows us to demonstrate horizontal transfer of genetic material between microorganisms through conjugation, but transformation and transduction can also contribute to spread of resistance and virulence genes [38].

Because of the significant exchange between the human microbiome, particularly the skin and intestinal tract, and the microbiome of the hospital environment (building), the essential role of the hospital microbiome is evident but far from fully understood [39, 40].

A more variable part of virulent microorganisms, often highly resistant to antimicrobial agents and capable of causing pathologic processes in patients, are added to the stable core of the hospital microbiome. The taxonomic composition of this part of the hospital microbiome depends on the type of department, medical technology, and patients and is highly correlated with the human skin microbiota. Its variability may also be determined by the peculiarities of the microbiome outside the medical organization and may be influenced by climatic factors such as average daily seasonal temperature and humidity. In intensive care units, the microbial community varies considerably with the season of the year, yet several pathogen species are present on surfaces of the hospital environment year-round, but there is very limited information on such relationships [29].

It remains to be determined whether the variation in the microbiome is essentially a stochastic process or whether deeper analysis will reveal patterns [41].

## Conclusion


Despite the very scarce data available to us, it is clear that molecular genetic technologies have opened up qualitatively new opportunities to study the hospital microbiome. This new direction will allow us to understand how the core of the microbiome is structured, which taxa play a key stabilizing role, what changes in this structure affect the process of formation of hospital strains (clones), and which determinants are the most informative in terms of monitoring and predicting epidemic disease. This new knowledge, together with antibiotic stewardship programs, epidemiological surveillance, isolation and restriction measures, disinfection and adherence to hand hygiene protocols, will provide effective approaches to preventing infections caused by the selection of hospital strains of microorganisms.

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., Ry-chagov 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., Kovalishe-na 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. Mahner 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 14<sup>th</sup> 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):13–7. Kroyder A.S., Komarova M.V. Using biological diversity indices for human mycobiota analysis. *Universum: Medicine & Pharmacology*. 2022;(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. Lerminiaux 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>

#### 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](mailto: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

#### 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](mailto: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



# Analysis of aerobiological studies with orthopoxviruses by U.S. Department of Defense

Gennadiy G. Onishchenko<sup>1,2</sup>, Igor A. Kirillov<sup>3</sup>, Sergey V. Borisevich<sup>2,4</sup>,  
Tatiana E. Sizikova<sup>4</sup>, Victor T. Krotkov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Management of the Chief of the Nuclear, Biological and Chemical Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>48 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>



Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-522>

# Анализ аэриобиологических исследований с ортопоксвирусами, проводимых Министерством обороны США

Онищенко Г.Г.<sup>1,2</sup>, Кириллов И.А.<sup>3</sup>, Борисевич С.В.<sup>2,4✉</sup>, Сизикова Т.Е.<sup>4</sup>, Кротков В.Т.<sup>4</sup><sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия;<sup>2</sup>Российская академия наук, Москва, Россия;<sup>3</sup>Управление начальника войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, Москва, Россия;<sup>4</sup>48 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 антропозооноза, 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>

## Introduction

The discontinuation of vaccination after the completion of the Global Smallpox Eradication Program has led to a dangerous situation, as a significant proportion of the world's population has become susceptible to both smallpox and other human pathogenic orthopoxviruses (OPVs) due to the loss of population immunity [1, 2]. The latter can lead to a global epidemic emergency [2, 3].

A clear example of this is the development of monkeypox outbreak in 2022-2023 (since 28.11.2023 the disease has been renamed by the Taxonomic Committee and is now known as "mpox") [4], the increase in the frequency of diseases caused by cowpox, buffalo pox and camelpox viruses in the world over the last 10-15 years [5].

In nature, representatives of various zoonoanthropotic OPVs circulate practically on all continents and periodically cause diseases among animals and humans. For example, isolated cases of poxvirus infections have been reported in Brazil and other parts of South America [6, 7]. Isolates from humans and livestock have been found to have a high degree of affinity to the vaccine virus [8, 9]. When investigating the possible role of primates as carriers of vaccine-like viruses, a high percentage of seropositive results was found [10].

Analysis of literature data on the organization of the OPV genome suggests that the smallpox pathogen may have arisen 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 anthrozoosis [11–13].

The **aim** of the review is to analyze open scientific published data on aerobiological research with OPVs conducted by the U.S. Department of Defense during the years 1994–2013. During this period, the World Health Organization imposed restrictions on research and storage of smallpox virus samples for all institutions worldwide, except for two international repositories: the Center for Disease Control and Prevention (USA) and the State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor (Russia)<sup>1</sup>.

The authors did not find any publications of the results of aerobiological studies with orthopoxviruses conducted by the US Department of Defense after 2013 in open scientific sources.

To study numerous aspects of the infection, specialists of research institutions of the US Department of Defense actively use various laboratory animals and pathogenic OPVs for them. These are white mice, lower primates (mainly Javan macaques, rhesus macaques) and rabbits. Ectromelia, cowpox and smallpox

vaccine viruses were used to infect mice, rabbitpox and smallpox vaccine viruses were used to infect rabbits, and smallpox vaccines were used to infect monkeys [14–16]. According to American researchers, the optimal model should combine the possibility of using a low infectious dose to infect animals and the transmission of the virus from a sick animal to a healthy one. The peculiarities of the spread of smallpox are modeled to the greatest extent using experimental work with smallpox of rabbits and monkeys.

The importance of rabbit pox virus as a model agent for studying OPV infections was demonstrated in the early 1960s, when it was shown that hyperimmune sera provided protection to aerogenically infected rabbits when administered immediately after infection at a dose of 175 PFU (plaque forming units) per individual or even 3 days after infection. In this experiment, a dry biological formulation with an average particle size of about 1  $\mu\text{m}$  was used [17].

Because aerosol particles larger than 10  $\mu\text{m}$  are trapped in the upper respiratory tract, in almost all aerogenic infection experiments conducted by US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) staff, the median diameter of generated particles penetrating the lower respiratory tract is 1  $\mu\text{m}$  [18]. A number of parameters characterizing the course of rabbit smallpox in aerogenically infected animals makes it possible to model human smallpox disease (**Table 1**).

Thus, at low infectious doses (< 200 PFU), the incubation period was 4–6 days. The first clinical sign of the disease was fever, followed by anorexia, weakness, rapid weight loss, depression, lethargy, drop in body temperature to subnormal values and death on the 8–14<sup>th</sup> day after infection.

At high infectious doses (more than 200 PFU), rabbit pox virus caused a rapidly progressive lethal infection resembling the hemorrhagic form of smallpox. The incubation period of the disease in this case was 2–3 days. The disease ended with death on the 6<sup>th</sup> day.

According to the data of the USAMRIID Aerobiology Research Center, the LD<sub>50</sub> value for aerogenic infection of rabbits with rabbit pox virus is 15 PFU [19]. This result coincides with the data obtained by H.S. Bedson et al. in 1963 using a dry preparation of rabbit pox virus [20].

When rabbits are aerogenically infected with a fine aerosol and the process of disease spread from one animal to another is studied, the above parameters are modeled for smallpox. Consequently, rabbit pox virus can be used to test protective agents against smallpox [19]. Rabbit smallpox virus can be used to model such characteristics of smallpox virus as the ability to cause aerogenic infection under conditions of low infectious dose and the ability to transmit infection from patients to healthy individuals [19]. M. Nicas et al. evaluated a mathematical model that determines the in-

<sup>1</sup> 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](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/59062/WHO_CDS_BVI_94.3.pdf?sequence=1)

**Table 1.** Similarities and differences between smallpox and rabbit pox (by aerosol route of infection) [19]

Parameter	Nosological form		
	Smallpox (common type)	rabbitpox (infectious dose < 200 PFU)	rabbitpox (infectious dose > 200 PFU)
Transmission method	Aerosol		
Incubation period, days	7–17	4–6	2–3
Prodromal phase, days	2–4		0–2
Clinical signs of the disease	Fever, pharyngitis, skin lesions	Fever, pharyngitis, skin lesions, erosions in the nasopharynx	Fever, pharyngitis, skin lesions, erosions in the nasopharynx
Characterization of skin lesions	Macules — papules — vesicles — pustules — crusts — poxinas	Macules — papules — vesicles — pustules	Macules — papules — vesicles
Complications	Pneumonia, blindness, encephalitis	Pneumonia, multiple necroses	
Lethality of the disease, %	≈ 30	≈ 100	100
Time of death, day from the beginning of the disease	22–28	8–14	5–7

**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]

PFU infectious dose, Me, D	Preparation	Administration process that provides:	
		total protection	partial protection
175 (146–175)	Purified hyperimmune serum	10 ml of 1 : 100 dilution when administered 1 day after infection or 10 ml of whole drug when administered on the 3 <sup>rd</sup> day after infection	10 ml of 1 : 10 dilution when administered on the 3 <sup>rd</sup> day after infection
> 1000	Thiosemicarbazone	None	100–200 mg/kg of animal weight daily for 4 days
2860 (1140–5000)	ST-246	40 mg/kg of animal weight for 14 days at the first injection immediately after infection	40 mg/kg animal weight for 14 days at first injection, 24, 48 or 72 h after infection
296 (96–468)	Цидофовир Cidofovir	10 mg/kg animal weight for 3 days at first injection, either immediately or 24 h after infection	1 mg/kg animal weight for 3 days at the first injection either immediately or 24 h after infection

**Note.** Me — median infectious dose; D — range of variation of infectious dose during the experiment.

fectious dose of smallpox virus for conditions of aerogenic infection [21]. The authors concluded that one complete virion is sufficient to infect a person.

C.J. Roy et al. conducted a comparative study of the efficacy of nonspecific defenses against smallpox [22]. The antiviral drugs thiosemicarbazone, cidofovir and ST-246 were tested using rabbit smallpox virus as a model agent. For comparison, experiments were carried out with administration of a specific protective agent, namely a purified hyper-immune rabbit serum, to animals. Data on the efficacy of these antiviral preparations at aerogenic infection of animals with rabbit pox virus (Table 2) indicate that full protection of animals was revealed when using cidofovir at a dose of 10 mg/kg of animal weight for 3 days at the first injection either

immediately or 24 h after infection, and ST-246 at a dose of 40 mg/kg of animal weight for 14 days (at the first injection immediately after infection). Thiosemicarbazone provided only partial protection.

A. Nalca et al. [19] and N.L. Garsa et al. [23] tested the efficacy of a third-generation smallpox vaccine (MVA-BN) in aerogenic infection of rabbits with rabbitpox virus. During a single immunization with a low dose of the vaccine, some rabbits showed some signs of disease, but all animals survived (Table 3). In case of double immunization with an interval of 14 days or a single immunization with a high dose of vaccine there were no signs of disease in animals.

Based on these studies, specialists from the USAMRIID Pathology, Toxinology and Aerobiology

**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]

Animal group	Percentage of animals with signs of disease, %	Percentage of surviving animals, %
Once immunized with a low dose of vaccine followed by infection	30	100
Twice immunized with a low dose of vaccine followed by infection	0	100
Once immunized with a high dose of vaccine	0	100
Control group (infected animals without immunization)	100	0
Control group (once immunized with a high dose of vaccine without infection)	0	100

**Note.** An infectious dose of rabbit pox virus 200 CFU/animal was used in challenge experiments. The low vaccine dose was  $1 \times 10^3$  PFU/specimen, and the high vaccine dose was  $1 \times 10^5$  PFU/specimen.

Departments consider rabbitpox virus to be a promising agent mimic for smallpox virus [24, 25].

In 1999, monkeypox virus was included by the Ad Hoc Group of States Parties to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction in the List of Biological Agents – Human Pathogens, which was recognized as significant in the context of developing a list of biologically destructive agents for specific measures to strengthen the “Convention...” [26]. It should be noted that according to the public opinion formed before the middle of 1998, smallpox of monkeys was considered as a zoonotic infection, which is not significant for human pathology.

When analyzing the outlined studies (including aerobiological studies) conducted with the monkeypox virus at the leading specialized foreign military-medical center, the US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, two significant directions can be distinguished: 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 smallpox vaccines.

According to N. Hahon, a member of the U.S. Army Chemical Corps, monkeypox virus allows modeling some basic characteristics of the disease caused by human smallpox virus. Thus, according to the literature, 4 species of lower primates (*Macaca cynomolgus*, *M. irus*, *M. rhesus*, and *Saimiri*) are susceptible to aerogenic infection with smallpox virus [14].

Experimental infection in Javan macaques by aerogenic infection with monkeypox virus was studied [27]. Monkeypox virus, strain Zaire-79, isolated in 1979 during a fatal human disease, was used in this work. The inoculum for aerosol formation was the supernatant of infected Vero cells. The average mass diameter of the aerosol particles was 1.2  $\mu\text{m}$ , and the calculated infectious dose ranged from  $1.0 \times 10^4$  to  $1.4 \times 10^5$  PFU. Javan macaques of both sexes weigh-

ing 1.6–4.7 kg were used in the experiment. The infectious dose was determined for each monkey during the entire exposure period (10 min). Aerosol sampling was performed in DMEM medium with defoamer. The virus concentration in the aerosol samples was determined by subsequent titration of the obtained samples using the negative colony method on a monolayer of Vero cells.

All infected monkeys died from the 10th to 17th day after infection (the average life time before the animals died was 11.2 days). Lethal outcome was associated with the development of bronchopneumonia. There was no correlation between the time of death and infectious dose.

Subsequently, an additional study of experimental infection was carried out during aerogenic infection of Javan macaques with monkeypox virus [28]. Infection was carried out using an automated system of biological aerosol exposure, which allows for precise administration of the infectious dose to each animal depending on its individual respiratory characteristics. The Zaire strain V79 was used in the aerogenic infection experiments. According to the data presented in **Table 4**, the outcome of the disease is apparently determined by the individual characteristics of the infected animals; in any case, no correlation between the administered dose and the proportion of dead animals was observed. At the same time, according to foreign military specialists, the clinical features of the disease in Javan macaques resemble the course of smallpox in humans [29].

Subsequently, the possibility of using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for quantitative determination of monkeypox virus in bioassays obtained from aerogenically infected Javan macaques was evaluated [30]. The sensitivity of the method was found to be 200 PFU/cm<sup>3</sup>. The infectious dose ranged from  $2.5 \times 10^4$  to  $9.3 \times 10^5$  PFU. The mean median aerosol particle size was 1.07  $\mu\text{m}$  and varied for each individual experiment between 1.06 and 1.09

**Table 4.** Results of the study of experimental infection indices during aerogenic infection of Javan macaques with monkeypox virus [28]

Indicator	Infectious dose, PFU			
	$4,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$
Fever				
onset, day after infection	4.7	3.8	2.8	4.3
duration, h	215.3	244.7	266.7	278.1
Temperature, °C				
maximum increase from normal	2.5	3.3	3.4	3.5
average increase from normal	1.9	1.9	2.1	2.3
Life expectancy before death, days	10.0	9.0	9.6	8.5
Percentage of dead animals	2/3	4/6	5/6	2/3

**Table 5.** Estimated virus concentration in the blood of monkeys aerogenically infected with monkeypox virus, PFU/cm<sup>3</sup> [31]

Infectious dose, PFU/cm <sup>3</sup>	Time after infection, days									
	0	2	4	6	8	10	14	18	21	
$4.2 \times 10^4$	< 200	< 200	$5.1 \times 10^3$	$7.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$	$1.2 \times 10^3$	< 200	
$2.5 \times 10^4$	< 200	< 200	< 200	$7.4 \times 10^4$	$3.0 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$4.1 \times 10^4$	< 200	< 200	
$1.2 \times 10^5$	< 200	< 200	$7.8 \times 10^3$	$1.8 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	**	–	–	–	
$2.8 \times 10^5$	< 200	< 200	< 200	$9.1 \times 10^4$	$3.6 \times 10^5$	**	–	–	–	
$3.9 \times 10^5$	< 200	< 200	$9.3 \times 10^3$	$4.8 \times 10^5$	*	–	–	–	–	
$9.3 \times 10^5$	< 200	< 200	$2.5 \times 10^4$	$6.9 \times 10^5$	$4.5 \times 10^6$	$4.8 \times 10^6$	***	–	–	

**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/cm<sup>3</sup>). \*The animal died on the 7<sup>th</sup> day; \*\*the animal died on the 9<sup>th</sup> day; \*\*\*the animal died on the 12<sup>th</sup> day after aerogenic infection.

**Table 6.** Estimated virus concentration in nasopharyngeal washings of monkeys aerogenically infected with monkeypox virus, PFU/cm<sup>3</sup> [31]

Infectious dose, PFU/cm <sup>3</sup>	Time after infection, days									
	0	2	4	6	8	10	14	18	21	
$4.2 \times 10^4$	< 200	< 200	< 200	$2.5 \times 10^3$	$1.1 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$	$6.3 \times 10^3$	< 200	
$2.5 \times 10^4$	< 200	< 200	< 200	< 200	$1.4 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$4.1 \times 10^4$	$3.5 \times 10^3$	< 200	
$1.2 \times 10^5$	< 200	< 200	< 200	< 200	$3.0 \times 10^4$	**	–	–	–	
$2.8 \times 10^5$	< 200	< 200	< 200	$8.4 \times 10^2$	$2.1 \times 10^5$	**	–	–	–	
$3.9 \times 10^5$	< 200	< 200	$3.2 \times 10^2$	$9.0 \times 10^5$	*	–	–	–	–	
$9.3 \times 10^5$	< 200	< 200	$5.3 \times 10^3$	$5.8 \times 10^4$	$1.9 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$	***	–	–	

µm. The LD<sub>50</sub> for monkeys for this mode of infection was approximately  $7.8 \times 10^4$  PFU, and the time to death was 7–10 days after infection. Viremia and virus concentration in nasopharyngeal washings from infected animals were determined by extrapolation of the results of quantitative RT-PCR.

As follows from the data presented in **Table 5** and **Table 6**, monkeypox virus is detected in blood and na-

sopharyngeal washings on the 4<sup>th</sup>–18<sup>th</sup> day after aerogenic infection. The onset of detection of the pathogen correlates with the infecting dose.

Taking into account that the course of monkeypox in Javan macaques can simulate human smallpox disease, it can be concluded that the probability of virus transmission from a sick person to a healthy person reaches a maximum on the 8<sup>th</sup>–10<sup>th</sup> day (the virus con-

**Table 7.** Results of evaluating the protective efficacy of 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation smallpox vaccines (against monkeypox virus during aerogenic infection of Javan macaques) [32]

Group	Immunization process	Characterization of the course of the disease				
		clinical signs	time of papule appearance, days	average number of papules	duration of papule disappearance, days	survival rate, %
1	Administration of buffered saline 28 days before infection (control)	+++	6	51	Didn't disappear	0*
2	Injection of Acam2000 once at a dose of $(2.5-12.5) \times 10^5$ PFU 28 days before infection by skin scarification	+	9	3	5	100
3	Subcutaneous injection of Imvamune once at a dose of $2.0 \times 10^8$ TCPD <sub>50</sub> 28 days before infection	++	9	10	5	67**
4	Subcutaneous injection of Imvamune twice at a dose of $2.0 \times 10^8$ TCPD <sub>50</sub> 28 days before infection	+	6	7	5	100

**Note.** TCPD<sub>50</sub> — 50% tissue cytopathic dose. + — mild; ++ — moderate; +++ — expressed signs of disease.  
 \*Animals died on the 7<sup>th</sup>–11<sup>th</sup> day; \*\*Animals died on the 7<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> day after aerogenic infection.

centration in nasopharyngeal washings has the highest values and approximately corresponds to the virus concentration in blood).

Specialists of the U.S. Department of Defense together with the U.S. Center for Disease Control and Prevention evaluated the protective efficacy of second-generation (Acam 2000) and third-generation (Imvamune) vaccines. In experiments on aerogenic infection of Javan macaques, monkeypox virus, strain Zaire 79, was used, with an infectious dose of  $(2.1-3.1) \times 10^5$  CFU per animal. The results presented in **Table 7** indicate that, although the level of virus-neutralizing

antibodies was not significantly different between animals of groups 2 and 4, the signs of disease were slightly more pronounced in group 4. It is concluded that the use of aerogenic infection of Javan macaques provides an assessment of the efficacy of various vaccines intended for human immunization under conditions where clinical trials are not feasible [32]. It was found that the dynamics of antibody production in vaccinated Javan macaques is similar to that in vaccinated humans [33, 34].

Despite the fact that the cowpox virus is not considered a potential biologically destructive agent, leading foreign military medical centers, including the

**Table 8.** Results of evaluation of susceptibility of BALB/c white mice to aerogenic infection with cowpox virus [35]

Average weight of animals, g	Infectious dose, PFU	Disease symptoms	Average survival time to death, days	Percentage of dead animals, %
12	$5 \times 10^6$	Reduced body weight, ruffled coat, significant decrease in functional activity	12	100
	$5 \times 10^4$	Decrease in body weight, slight decrease in functional activity	–	0
	$5 \times 10^2$	None	–	0
17	$5 \times 10^6$	Decrease in body weight and functional activity	12	65

**Table 9.** Results of a study of the susceptibility of white mice to aerosolized infection with ectromelia, vaccinia and cowpox viruses [16]

Virus	Strain	White mouse line	Infection method	Infectious dose, PFU	Disease symptoms
Ectromelia	Hampstead	Autobred animals	Intranasal	$1 \times 10^6$	Inflammation of the bronchi, alveoli, pleura
			Aerosol	$1 \times 10^6$	Inflammation of the bronchi, alveoli, pleura
Vaccines	WR	BALB/c	Intranasal	$1 \times 10^6$	Bronchopneumonia with manifestations of necrosis
Cowpox	Brighton	BALB/c	Aerosol	$5 \times 10^6$	Bronchopneumonia, rhinitis, sinusitis, meningitis, exanthema

U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, conduct research with this pathogen. Analysis of the data published in the open press indicates that cowpox virus is also used in studies to evaluate the efficacy of existing and newly developed nonspecific prophylaxis against smallpox.

The results of the assessment of the susceptibility of BALB/c mice to aerogenic infection with cowpox virus (**Table 8**) indicate that aerogenic infection of BALB/c mice weighing 12 g with cowpox virus, Brighton strain, at a dose of  $5 \times 10^6$  PFU causes 100% mortality of the animals.

Data on the susceptibility of inbred white mice to intranasal and aerosol infection with various OPVs (**Table 9**) indicate that all tested viruses caused respiratory tract damage. In case of aerosol infection with

cowpox virus, symptoms of meningitis and exanthema were also recorded.

The study of morphologic changes in tissues of white BALB/c mice during intranasal or aerosol infection with cowpox virus, Brighton strain (**Table 10**) indicates that this pathogen is a promising model agent for screening tests of nonspecific prophylaxis against smallpox. This is due to the fact that the disease caused by this strain in the aerosol method of infection of white mice is characterized by a variety of symptoms, as well as the fact that this pathogen is pathogenic for humans, which simplifies the possibility of extrapolating the obtained data regarding the antiviral efficacy of the investigated therapeutic and prophylactic agents.

Thus, the antiviral effect of cidofovir (1-[(S)-3-hydroxy-2]-(phosphonomethoxy)-propyl cytosine) was

**Table 10.** Results of morphologic changes in tissues of white BALB/c mice during intranasal or aerogenic infection with cowpox virus, Brighton strain [24]

Tissues and organs	Morphologic changes	Infection method	Presence of cowpox virus antigen in organs
Lungs, bronchi, bronchioles, alveoli	Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Aerosol	+
		Intranasal	+
Bronchiolar vessels	Inflammation, necrosis, degeneration, inclusion bodies	Aerosol	+
Pleura	Inflammation	Aerosol	–
Trachea	Inflammation, eczema, necrosis, corpuscles	Aerosol	+
Nasal tract	Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Aerosol	+
		Intranasal	+
Glands	Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Aerosol	+
		Intranasal	+
Connective tissues	Inflammation, hemorrhages	Aerosol	+
		Intranasal	+
Mammary gland ducts	Inflammation, necrosis, inclusion bodies	Aerosol	–
			+
Nasopharyngeal ducts	Inflammation, eczema, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Intranasal	+
Eustathian pipe	Inflammation, inclusion bodies	Intranasal	+
Middle ear	Inflammation, necrosis, hemorrhages, inclusion bodies	Aerosol	+
		Intranasal	–
Muscles	Inflammation, necrosis, inclusion bodies, tissue regeneration	Aerosol	+
Bone marrow	Myelogenous hyperplasia	Aerosol	–
		Aerosol	+
Tail, skin	Inflammation, necrosis, inclusion bodies, epidermal proliferation	Aerosol	–
		Intranasal	+

**Note.** + — detection of labeled viral antigen by immunohistological method; – — No detection of labeled viral antigen.

studied on the model of white BALB/c mice aerogenically infected with cowpox virus, Brighton strain [35]. This strain causes bronchopneumonia in BALB/c mice when aerogenically infected with a fine aerosol (particle size 1 μm) with subsequent death. Subcutaneous administration of cidofovir at a dose of 100 mg/kg (once) provided 90–100% protection of aerogenically infected animals when administered not later than 4 days after infection. When cidofovir was administered on the day of infection, the virus titer in the lungs decreased 10–100 times, the severity of viral pneumonia decreased and pulmonary hemorrhages were prevented.

Administration of cidofovir did not cause an increase in the concentration of urea, creatine, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in the blood sera of infected and intact animals. It was found that the disease did not develop with daily subcutaneous administration of cidofovir at doses of 20.5 and even 1 mg/kg. The time of the first administration of the drug is important. The dose of 5 m/kg protected almost 100% of mice when the drug was administered on the day of infection. However, if the beginning of drug administration was delayed for at least 1 day, daily administration of higher doses was required to protect the animals. Aerosol application of cidofovir was sig-

nificantly more effective [36, 37]. The results of determining body weight, virus concentration in the lungs, pathologic changes in the lungs, and survival of infected animals established that a dose of cidofovir in the range of 0.5–5.0 mg/kg was always more effective than a dose of 25 mg/kg, and sometimes even more effective than a dose of 100 mg/kg when administered subcutaneously. Consequently, the antiviral efficacy of cidofovir is largely due to the drug retention in the respiratory tract of animals. Subsequently, the dependence of the antiviral efficacy of cidofovir on the scheme of its administration into the body of white mice aerogenically infected with cowpox virus was determined [37] (Table 11). Based on the results obtained, the authors of the study concluded that cidofovir when administered aerosolized can be effective in the prophylaxis or emergency prophylaxis of smallpox or monkeypox.

Analysis of the presented data indicates that specialists of the US Department of Defense use cowpox virus as a model agent for screening tests and methods of application of nonspecific medical defenses against smallpox. When summarizing the results of the presented studies, it is possible to conclude about the dual-use character of the conducted research. Thus, it can be stated that the USAMRIID staff has substantiated the

**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  $5 \times 10^6$  PFU [37]

Method of drug administration	Dose, mg/kg	Period of drug administration, day	Ratio of surviving to infected animals	Percentage of surviving animals, %	<i>p</i>
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	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
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
Placebo		0	0/10	0	–

**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.



choice of rabbit pox and monkey pox viruses as agent mimics of the smallpox virus.

At the same time, the data obtained in the early 2000s were compared by US military specialists with the results obtained in the early 1960s using a dry agent mimic based on rabbitpox virus [20]. In their opinion, the rabbit pox virus can simulate such characteristics of the smallpox virus as the level of reproduction in various systems, including cell cultures in suspension cultivation, and resistance when transferred to aerosol. The LD<sub>50</sub> value for rabbits during aerogenic infection is quite low (in contrast to other laboratory animals during aerogenic infection with other OPVs) [19].

When conducting aerobiological studies, special attention was paid to the fractional-disperse composition of the agent simulant. Such specification is obviously unnecessary for the declared by the authors goals of the conducted studies. As an infectious preparation for these studies, in most of the research projects of US-AMRIID staff, the direct culture of monkey pox and rabbit pox virus strains was used. However, according to a number of indirect signs (composition of sampling

fluids, presence of different concentrations of defoamer, different concentrations of fetal calf serum), it can be concluded that in reality, during a number of aerobiological tests, virus-containing materials obtained by growing the pathogen in suspension cell culture were used as an infectious preparation.

### Conclusion

The presented results of aerobiological studies with OPVs indicate the interest of the U.S. Military Department in conducting dual-purpose experimental work, including monitoring for the properties of OPVs and possible changes in their pathogenicity for humans, selection of optimal laboratory models for studying the properties of OPVs as well as the possibility of modeling the properties of smallpox virus using other OPVs (cowpox, rabbitpox, monkeypox viruses), modeling the main properties of the disease caused by smallpox virus in humans and evaluation of the efficacy of available and newly developed smallpox vaccines, and the comparative study of the efficacy of antiviral drugs for regular or post-exposure prophylaxis of naturally occurring smallpox and monkey smallpox.

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/jtfhat>
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. Hahon 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., Habbard 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>
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>

ОБЗОРЫ

### 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*<sup>✉</sup> — 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, [48cnii@mil.ru](mailto:48cnii@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

### 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*<sup>✉</sup> — д.б.н., профессор, академик РАН, начальник 48 ЦНИИ Минобороны России, Сергиев Посад-6, Россия, [48cnii@mil.ru](mailto:48cnii@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

Научный обзор  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-486>



## Технология получения моноклональных антител. 50 лет развития

Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н.<sup>✉</sup>, 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<sup>✉</sup>, 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 животных<sup>1</sup>. 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 Шибальскими<sup>2</sup>. Дж. Литтлфилд в 1964 г. описал успешное использование среды ГАТ для отбора гибридов соматических клеток<sup>3</sup>. 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-

<sup>1</sup> 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).

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> 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)<sup>4</sup>. По данным за 2022 г., в

<sup>4</sup> 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»<sup>5</sup>; 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 Fab<sub>2</sub>-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

<sup>5</sup> 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 клетки<sup>6</sup>. 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-

<sup>6</sup> APExBIO. 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 гипермутагенез 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 мышиных 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» (иммортизированные) 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 лабораторий 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 варибельными 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 стран<sup>7</sup>. 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

<sup>7</sup> Unitaaid. Hepatitis C diagnostics technology landscape; 2019. URL: [https://unitaid.org/assets/HepC-Dx-Tech-Landscape\\_May2019.pdf](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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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](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](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 иммунологии.* 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., Sulfiandi 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](mailto: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](mailto: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!*