

5

СЕНТЯБРЬ—ОКТАБРЬ

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

5

SEPTEMBER — OCTOBER

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.

5

СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ

**ТОМ 101
2024**

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

Свидетельство ПИ № ФС77-75442

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

DOI prefix: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

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

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

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

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

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

ПОДПИСКА:

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

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

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

УЧРЕДИТЕЛИ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
www.crie.ru

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

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

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

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*

Осокина Ольга Владимировна

РЕДАКЦИЯ:

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

Заведующая редакцией:

Устинкова Ольга Владимировна

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

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

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

Подписано в печать 29.10.2024.
Формат 60×90^{1/2}. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

Заместители главного редактора

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

Ответственные секретари

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

Shubhada Vopengam, 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, Turkab, 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

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

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.

5

SEPTEMBER – OCTOBER

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 Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

The CrossMark service is used.

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

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

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

Index for subscription to the printed version of the journal:

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

Full texts of issues of the journal are available:

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

FOUNDERS:

Central Research Institute for Epidemiology
www.crie.ru

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

PUBLISHER:

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

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

Signed to the press on October 29, 2024.

Print format 60×90^{1/8}.

Circulation 158 copies.

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

Deputy Editors

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

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

Executive Secretaries

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

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

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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), Martinsovsky 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. Tartakovsky, 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

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

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

Акимкин В.Г. Поздравление со столетием «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии»	579
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
Кириченко А.А., Киреев Д.Е., Сидорина Ю.Н., Абашина Н.Д., Брусенцева Е.Е., Акимкин В.Г. Пилотное исследование по изучению особенностей распространения резистентных вариантов ВИЧ-1 с помощью молекулярных кластеров*	581
Вавилова И.В., Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О., Воронина Д.В., Голдоевская П.П., Зрелкин Д.И., Джаруллаева А.Ш., Должикова И.В., Щепляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Исследование тропизма и биораспределения рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> *	594
Найденова Е.В., Захаров К.С., Агафонов Д.А., Карташов М.Ю., Сеничкина А.М., Халилов Э.С., Ibrahim A.B., Bah M.B., Nouridine I., Токаревич Н.К., Boumbaly S., Sidime Y., Щербакоева С.А., Кутырев В.В. Современные данные о циркуляции возбудителя лихорадки Ку на территории Гвинейской Республики*	606
Прокопенко П.И., Степанова Е.А., Матюшенко В.А., Рак А.Я., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С., Кудрявцев И.В., Рубинштейн А.А., Комлев А.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Усиление системного и локализованного в легких CD4 ⁺ -Т-клеточного иммунного ответа при укорочении белка NS1 штамма сезонной живой гриппозной вакцины*	619
Жданова С.Н., Вязовая А.А., Лебедева И.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Шеварц Я.Ш., Рычкова Л.В., Брусина Е.Б., Мокроусов И.В., Огарков О.Б. Циркуляция штаммов <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing Central Asian Outbreak в Кемеровской области — Кузбассе в 2018–2022 годах*	628
Рудометова Н.Б., Рудометов А.П., Фандо А.А., Вахитов Д.И., Ильичев А.А., Агафонов А.П., Карпенко Л.И. Получение нового варианта растворимого тримера Env ВИЧ-1 CRF63_02A6 SOSIP.664*	642
Мошков Г.Д., Мошков А.Е., Мошков Д.А. Самореплицирующиеся рекомбинантные вирусоподобные частицы лентивирусов, размножающиеся в клетках глиобластомы и макрофагах человека*	650
Лапин В.А., Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Мелентьев Д.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е., Новиков В.В. Получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и его антигенные и иммуногенные свойства*	661
Шумилова В.Н., Гончаров А.Е., Азаров Д.В., Ситкин С.И., Латария Э.Л., Асланов Б.И., Бобраков М.А., Топузов Р.Э. Детекция генетических детерминант потенциально онкогенных представителей микробиоты кишечника в качестве биомаркеров колоректального рака*	668
Карпова Л.С., Пелих М.Ю., Столяров К.А., Волик К.М., Столярова Т.П., Даниленко Д.М. Анализ эпидемий гриппа на фоне пандемии COVID-19 с использованием усовершенствованной системы надзора (с 2021 по 2024 год)*	679
НАУКА И ПРАКТИКА	
Ковальчук С.Н., Архипова А.Л., Ковылькова С.Ю., Ильина Е.Н., Федорова Л.С. Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени для выявления генов <i>qacA/B</i> и <i>smr</i> у грамположительных бактерий*	692
ОБЗОРЫ	
Пунченко О.Е., Пунченко Е.В., Гостев В.В., Савченко М.В. Определение чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков и фагов: обзор литературы*	699
ЮБИЛЕИ	
90 лет Ростовскому-на-Дону противочумному институту: история, достижения и перспективы	706
ХРОНИКА	
Резолюция V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 10–11 октября 2024 года)	710

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

CONTENTS

Akimkin V.G. Congratulations on the centenary of the "Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology"	579
ORIGINAL RESEARCHES	
Kirichenko A.A., Kireev D.E., Sidorina Yu.N., Abashina N.D., Brusentseva E.E., Akimkin V.G. The pilot study of the features of HIV-1 resistant variants spread using molecular clusters*	581
Vavilova I.V., Ozharovskaia T.A., Zubkova O.V., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Zrelkin D.I., Dzharullaeva A.S., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Yu, Gintsburg A.L. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> tropism and biodistribution of recombinant simian adenovirus type 25*	594
Naidenova E.V., Zakharov K.S., Agafonov D.A., Kartashov M.Yu., Senichkina A.M., Khalilov E.S., Ibrahim A.B., Bah M.B., Nourdine I., Tokarevich N.K., Boumbaly S., Sidime Y., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Current data on the circulation of the Q fever pathogen in the Republic of Guinea*	606
Prokopenko P.I., Stepanova E.A., Matyushenko V.A., Rak A.Ya., Chistjakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S., Kudryavtsev I.V., Rubinstein A.A., Komlev A.S., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Enhancement of systemic and lung-localized CD4 ⁺ T-cell immune responses by truncation of NS1 protein of a seasonal live influenza vaccine strain*	619
Zhdanova S.N., Vyazovaya A.A., Lebedeva I.B., Sinkov V.V., Kondratov I.G., Schwartz Ya.Sh., Rychkova L.V., Brusina E.B., Mokrousov I.V., Ogarkov O.B. Circulation of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains of the Beijing Central Asian Outbreak genotype in the Kemerovo region — Kuzbass in 2018–2022*	628
Rudometova N.B., Rudometov A.P., Fando A.A., Vahitov D.I., Ilyichev A.A., Agafonov A.P., Karpenko L.I. Production of a new variant of soluble trimer Env of HIV-1 CRF63_02A6 SOSIP.664*	641
Moshkoff H.D., Moshkoff A.E., Moshkoff D.A. Self-replicating recombinant virus-like particles of lentivirus proliferating in glioblastoma cells and normal human macrophages*	650
Lapin V.A., Novikov D.V., Mokhonova E.V., Melentyev D.A., Tsiganova M.I., Zaitsev D.E., Novikov V.V. Production of recombinant norovirus VP1 protein and its antigenic and immunogenic properties*	661
Shumilova V.N., Goncharov A.E., Azarov D.V., Sitkin S.I., Latariya E.L., Aslanov B.I., Bobrakov M.A., Topuzov R.J. Detection of genetic determinants of potentially oncogenic representatives of the intestinal microbiota as biomarkers of colorectal cancer*	668
Karpova L.S., Pelikh M.Yu., Stolyarov K.A., Volik K.M., Stolyarova T.P., Danilenko D.M. Analysis of influenza epidemics during the COVID-19 pandemic using an improved surveillance system (from 2021 to 2024)*	679
SCIENCE AND PRACTICE	
Kovalchuk S.N., Arkhipova L.S., Kovylkova S.Yu., Ilina E.N., Fedorova L.S. Multiplex real-time PCR for detection of <i>qac A/B</i> and <i>smr</i> genes in Gram-positive bacteria*	692
REVIEWS	
Punchenko O.E., Punchenko E.V., Gostev V.V., Savchenko M.V. Study of bacterial susceptibility to antibiotic and phage combinations: a literature review*	699
ANNIVERSARIES	
90 years of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute: history, achievements and prospects	706
CHRONICLE	
Resolution of the V All-Russian scientific and practical conference with international participation "Modern immunoprophylaxis: challenges, opportunities, prospects" (Moscow, October 10–11, 2024)	710



ПОЗДРАВЛЕНИЕ СО СТОЛЕТИЕМ «ЖУРНАЛА МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ»

Глубокоуважаемые коллеги!

В 2024 году «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» отмечает столетие своей деятельности!

От лица учредителей и издателя журнала — Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» и Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора — позвольте поздравить читателей, авторов, рецензентов и всех, кто прилагает огромные усилия к развитию журнала, с юбилеем!

Сегодня «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» — одно из наиболее уважаемых научных периодических медицинских изданий России, площадка междисциплинарной интеграции фундаментальных и прикладных исследований для разработки технологий борьбы за санитарно-эпидемиологическое благополучие населения.

С момента создания журнала в редакционную коллегию входили выдающиеся российские учёные А.И. Абрикосов, С.В. Коршун, И.Л. Кричевский, Ф.Я. Чистович, академики В.Д. Беляков, А.Ф. Билибин, И.Н. Блохина, С.В. Прозоровский, П.А. Вершилова, Г.В. Выгодчиков, В.М. Жданов, П.Ф. Здродовский и др. Именно они стали основателями российских научных школ в области эпидемиологии, гигиены, микробиологии, иммунологии, патологической анатомии, инфекционных болезней, организации здравоохранения.

За истекший век журналом выпущено в свет 1028 номеров, опубликовано 19 903 статьи. В мирное время и в периоды потрясений «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» служил профилактике инфекций, строящейся на изучении их сущности, а также глубоком постижении теоретических основ эпидемиологии и иммунологии.

Сквозь столетие во главу угла своей деятельности журнал ставит доверие и уважение врачей и учёных. Именно поэтому «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» стремится публиковать самые актуальные, востребованные практикой результаты научных исследований, рассматривает развитие института рецензирования как гарантию качества научных публикаций и важную задачу для передачи научного опыта.

Бессменным учредителем журнала является Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. В 2019 году в состав учредителей журнала вошёл и взял на себя функции издателя Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора. Издатель, являясь головным научно-исследовательским институтом России в области эпидемиологии, как никто другой осознаёт важность развития научной основы для создания технологий и средств борьбы с инфекциями, особенно актуального в период внешних угроз и наличия технологических возможностей для использования инфекционных агентов в качестве управляемых факторов политического влияния.

Совместные усилия главного редактора «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» академика Российской академии наук Виталия Васильевича Зверева, издателя журнала — Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, редакционной коллегии способствовали стремительному росту международной значимости издания. Пройдя все сложные времена, журнал не ставит своей задачей коммерческую прибыль. Политика журнала строится на бесплатном доступе российских и зарубежных читателей к полным текстам, неприемлемости публикации явной и скрытой рекламы, а также взимания платы с авторов.

Издатель прилагает организационные и финансовые усилия для развития «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» — использования самых современных издательских технологий, обеспечения доступности статей для мировой читательской аудитории, индексации ведущими международными библиографическими базами, привлечения ведущих учёных в качестве авторов и рецензентов.

Хочу выразить свою признательность и уважение нашим авторам, главному редактору, членам редакционной коллегии и редакционного совета, рецензентам, сотрудникам редакции — всем, кто прилагал силы к становлению и развитию журнала на протяжении 100 лет!

*Директор
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Председатель Президиума
Общероссийской общественной организации
«Всероссийское научно-практическое общество
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»
академик РАН*

В.Г. Акимкин

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-565>



Пилотное исследование по изучению особенностей распространения резистентных вариантов ВИЧ-1 с помощью молекулярных кластеров

Кириченко А.А.^{1✉}, Киреев Д.Е.¹, Сидорина Ю.Н.², Абашина Н.Д.², Брусенцева Е.Е.², Акимкин В.Г.¹

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

²Орловский центр СПИД, Орел, Россия

Аннотация

Введение. Благодаря рутинному тестированию лекарственной устойчивости (ЛУ) ВИЧ-1 накапливается значимое количество нуклеотидных последовательностей (НП) вируса и эпидемиологических данных о ВИЧ-инфицированных лицах, что вместе с активным внедрением в практику биоинформатических методов позволяет использовать их для изучения особенностей распространения резистентных вариантов ВИЧ-1 с помощью анализа молекулярных кластеров.

Цель исследования — апробация анализа молекулярных кластеров на территории пилотного региона России с использованием значимого количества НП для изучения особенностей распространения резистентных вариантов ВИЧ-1.

Материалы и методы. Получены НП ВИЧ-1 от 899 ВИЧ-инфицированных пациентов, состоявших на диспансерном учёте в Орловском центре СПИД в 2016–2021 гг. Определены генетические варианты ВИЧ-1 с помощью базы данных Стенфордского университета, REGA и HIV BLAST. Выявлены мутации резистентности и определена прогностическая ЛУ ВИЧ-1 с использованием базы данных Стенфордского университета. Проведён филогенетический анализ в программе «MEGA». Выявлены молекулярные кластеры ВИЧ-1 с помощью программного обеспечения «Cluster Picker».

Результаты. На территории пилотного региона доминировал суб-субтип А6 (85,7%), отмечено увеличение доли CRF63_02A6. Резистентность ВИЧ-1 была обнаружена у 13,6% пациентов без опыта антиретровирусной терапии (АРТ) и у 52,0% с опытом АРТ. Молекулярные кластеры чаще образовывали НП ВИЧ-1 от пациентов без опыта АРТ. ЛУ-варианты ВИЧ-1 реже попадали в молекулярные кластеры. Источниками передаваемых мутаций чаще являлись пациенты с опытом АРТ. Наиболее активно и эффективно передавались мутации *K103N*, *V179E/T*, *Y181C*, *G190S*, ассоциированные с устойчивостью вируса к эфавирензу и невирапину.

Заключение. Применение анализа молекулярных кластеров, предоставляющего информацию об особенностях распространения резистентных вариантов ВИЧ-1, может быть рекомендовано к использованию в России с целью разработки стратегий профилактики предотвращения передачи ЛУ-вариантов вируса и повышения эффективности лечения.

Ключевые слова: ВИЧ-1, лекарственная устойчивость, мутации резистентности, антиретровирусная терапия, молекулярные кластеры, кластеры передачи, эпидемиологический надзор, геномный эпидемиологический надзор

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 93 от 18.06.2019).

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: Кириченко А.А., Киреев Д.Е., Сидорина Ю.Н., Абашина Н.Д., Брусенцева Е.Е., Акимкин В.Г. Пилотное исследование по изучению особенностей распространения резистентных вариантов ВИЧ-1 с помощью молекулярных кластеров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5): 581–593.


DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-565>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-565>

The pilot study of the features of HIV-1 resistant variants spread using molecular clusters

Alina A. Kirichenko¹, Dmitry E. Kireev¹, Yulia N. Sidorina², Natalia D. Abashina², Elena E. Brusentseva², Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia;

²Oryol AIDS Center, Oryol, Russia

Abstract

Introduction. As a result of routine testing of HIV-1 drug resistance (DR), a significant amount of viral nucleotide sequences and epidemiological data of HIV-infected individuals have been collected. Combined with the increasing use of bioinformatics methods in practice, it has become possible to study the features of HIV-1 resistant variants spread using molecular clustering analysis.

The **aim** of the study was to validate the molecular clustering analysis in a pilot region of Russia using a significant number of nucleotide sequences to study the features of the spread of HIV-1 resistant variants.

Materials and methods. HIV-1 nucleotide sequences were obtained from 899 HIV-infected patients who were registered at the Oryol AIDS Center in 2016–2021. HIV-1 genetic variants were determined using the Stanford University database, REGA and HIV BLAST. Resistance mutations and prognostic HIV-1 DR were determined using the Stanford University database. Phylogenetic analysis was carried out using the MEGA program. HIV-1 molecular clusters were identified using Cluster Picker software.

Results. In the pilot region, sub-subtype A6 dominated (85.7%); an increase in the share of CRF63_02A6 was noted. HIV-1 resistance was found in 13.6% of patients without antiretroviral therapy (ART) experience and in 52.0% with ART experience. Molecular clusters were more often formed by HIV-1 nucleotide sequences from ART-naïve patients. HIV-1 DR variants were less likely to fall into molecular clusters. The sources of transmitted mutations were more often patients with ART experience. The most actively and efficiently transmitted mutations were *K103N*, *V179E/T*, *Y181C* and *G190S*, associated with virus resistance to efavirenz and nevirapine.

Keywords: HIV-1, drug resistance, resistance mutations, antiretroviral therapy, molecular clusters, transmission clusters, surveillance, genomic surveillance

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The local Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (Protocol No. 93, June 18, 2019) approved the study.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Kirichenko A.A., Kireev D.E., Sidorina Yu.N., Abashina N.D., Brusentseva E.E., Akimkin V.G. The pilot study of the features of HIV-1 resistant variants spread using molecular clusters. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):581–593.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-565>

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

Введение

Широкое применение антиретровирусной терапии (АРТ) в значительной мере снижает заболеваемость и смертность людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ) [1, 2], а также уменьшает риск передачи ВИЧ-инфекции [3, 4]. Вместе с тем расширение охвата АРТ ВИЧ-инфицированных пациентов неизбежно приводит к возникновению и распространению лекарственной устойчивости (ЛУ) вируса, что ставит под угрозу эффективность АРТ [5, 6]. С вирусологической неэффективностью АРТ в России ежегодно сталкивается не менее 20% ВИЧ-инфици-

рованных пациентов¹, основной причиной которой является ЛУ ВИЧ-1.

Отсутствие мер по противодействию возникновению и распространению ЛУ-вариантов ВИЧ-1 приведёт к снижению эффективности АРТ, повышению заболеваемости и смертности, ухудшению здоровья

¹ Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Справка. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2022 г. URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2023/09/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2022.pdf> (дата обращения: 08.07.2024).

ЛЖВ, уменьшению доступных терапевтических возможностей для пациентов, что повлечёт за собой увеличение экономических затрат на противодействие эпидемии ВИЧ-инфекции [7, 8]. Таким образом, ЛУ ВИЧ-1 представляет собой клиническую, эпидемиологическую и экономическую угрозу для достижения контроля над эпидемией ВИЧ-инфекции.

В связи с этим в России были разработаны рекомендации по определению ЛУ ВИЧ-1 в клинической практике для повышения эффективности лечения на индивидуальном уровне² и как одного из компонентов эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией для повышения эффективности АРТ и снижения распространения ЛУ ВИЧ-1 на уровне популяции ВИЧ-инфицированных лиц³.

В России надзорные исследования за ЛУ ВИЧ-1 проводятся несистематически, однако тест на ЛУ ВИЧ-1 на индивидуальном уровне является одним из рутинных видов анализа эффективности проводимой АРТ, включён в стандарты первичной медико-санитарной помощи при ВИЧ-инфекции⁴ и ежегодно проводится не менее 7 тыс. ВИЧ-инфицированных пациентов⁵. Благодаря рутинному тестированию ЛУ ВИЧ-1 накапливается значимое количество нуклеотидных последовательностей (НП) ВИЧ-1 и сопутствующих эпидемиологических данных о ВИЧ-инфицированных лицах, что вместе с активным внедрением в практику биоинформатических методов позволило развить новое направление, получившее название геномного эпидемиологического надзора [9]. В 2021 г. во время пандемии COVID-19 Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) призвала страны усилить роль геномного эпидемиологического надзора для более глубокого изучения особенностей передачи возбудителей инфекционных болезней, обладающих пандемическим и эпидемическим потенциалом, с целью разработки вакцин, лекарственных препаратов, диагностических тест-систем, а также для принятия мер, направленных на предотвращение распространения инфекций⁶.

Одним из важнейших инструментов для осуществления геномного эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией является определение молекулярных кластеров, т. е. НП ВИЧ-1, имеющих высокое генетическое сходство⁷ и позволяющих предположить наличие эпидемиологической связи между ВИЧ-инфицированными лицами, от которых они получены [10]. Кластеризация НП ВИЧ-1 свидетельствует о более активной передаче вируса [11] и позволяет определять очаги повышенной заболеваемости, а также охарактеризовать когорту, в которой происходит наиболее активная передача ВИЧ-1, для проведения эффективных противоэпидемических мероприятий. В настоящее время Центр по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) выделяет определение молекулярных кластеров и быстрое реагирование на них как один из основных принципов, необходимых для окончания эпидемии ВИЧ-инфекции, наряду с ранней диагностикой, быстрым и эффективным лечением и профилактикой в группах риска [12].

Для проведения таких исследований ключевым фактором является «плотность выборки» ВИЧ-инфицированных, т. е. доля лиц, для которых известна НП ВИЧ-1, среди всех выявленных ЛЖВ на изучаемой территории. При «плотности выборки» менее 10% достоверность и точность получаемых результатов значительно снижается [13].

В России биоинформатические методы в эпидемиологическом надзоре применяются только с целью проведения расследования случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи⁸. В свою очередь исследования, посвящённые анализу молекулярных кластеров в эпидемиологическом надзоре за ЛУ-вариантами ВИЧ в России, не проводились.

В связи с этим **цель** настоящего исследования заключалась в апробации анализа молекулярных кластеров на территории пилотного региона России с использованием значимого количества НП для изучения особенностей распространения резистентных вариантов ВИЧ-1.

Материалы и методы

Исследуемая выборка

В исследование были включены 899 ВИЧ-инфицированных пациентов, состоявших на диспансерном учёте в БУЗ Орловской области «Орловский центр СПИД» в период с 2016 по 2021 г.

² Клинические рекомендации «Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ». М.; 2017. URL: https://fedlab.ru/upload/media-library/f38/_-10_04_2017_.pdf (дата обращения: 08.07.2024).

³ Методические рекомендации МР 3.1.5.0075/1-13 «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам». М.; 2013.

⁴ Приказ Министерства здравоохранения РФ № 438н от 23.06.2022 «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи взрослым при ВИЧ-инфекции (диагностика, лечение и диспансерное наблюдение)».

⁵ Международная коалиция по готовности к лечению, Восточная Европа и Центральная Азия. Анализ закупок средств диагностики для лечения ВИЧ в России в 2020–2021 годах. 2022. URL: <https://itpc-eecca.org/wp-content/uploads/2022/07/monitoring-testov-vich-2020-21-gg-1.pdf>

⁶ World Health Organization. Global genomic surveillance strategy for pathogens with pandemic and epidemic potential, 2022–2032. 2022. 32 p. URL: <https://www.who.int/publications/item/9789240046979> (дата обращения: 08.07.2024).

⁷ CDC. A guide for health departments: detecting and responding to HIV Transmission Clusters, 2018. 2019. 131 p. URL: <https://www.cdc.gov/hiv/programresources/guidance/cluster-outbreak/index.html> (дата обращения: 08.07.2024).

⁸ Методические указания Роспотребнадзора МУ 3.1.3342-16 «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией». М.; 2016.

Критерии включения в исследование: диагноз ВИЧ-инфекции, подтверждённый в соответствии с национальными клиническими протоколами, а также наличие данных о пациенте: пол, дата первого положительного результата иммунного блоттинга и опыт приёма антиретровирусных препаратов (АРВП).

Критерием невключения являлась вирусная нагрузка менее 500 копий/мл РНК ВИЧ-1.

От всех пациентов или их законных представителей (если пациенту на момент исследования было менее 18 лет) получено информированное согласие до выполнения процедур, связанных с настоящим исследованием. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 93 от 18.06.2019).

Экстракция РНК и секвенирование ВИЧ-1

Экстракцию РНК ВИЧ-1 из плазмы крови и секвенирование амплифицированных фрагментов гена *pol*, кодирующих протеазу и часть обратной транскриптазы (2253–3368 н.п. относительно референсного штамма HXB2, GenBank #K03455), осуществляли с помощью набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) с использованием секвенатора «Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer» («Life Technologies») либо с помощью *in house* метода с использованием секвенатора следующего поколения «MiSeq» («Illumina»).

Обработку данных секвенирования и получение консенсусной последовательности осуществляли с помощью программного обеспечения «ДЕОНА» (версии 1.2.3, 1.7.0) («РМБит») для данных классического секвенирования и с помощью программ «Trimmomatic» [14] и «VirGenA» [15] для данных секвенирования следующего поколения с установленным 20% порогом чувствительности к минорным вариантам ВИЧ-1.

Все НП подвергались контролю качества, который проводили с использованием инструмента «WHO BCCfE HIVDR QC»⁹.

Полученные НП ВИЧ-1, а также сопутствующие эпидемиологические и лабораторные данные о пациентах были загружены в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к АРВП¹⁰.

Определение генетических вариантов ВИЧ-1

Определение генетических вариантов ВИЧ-1 проводили с использованием инструментов базы данных Стенфордского университета HIVdb (v. 9.1)¹¹ и REGA HIV-1 Subtyping Tool (v. 3.0)¹².

В случае получения дискордантных результатов между двумя указанными инструментами НП анализировали с помощью инструмента HIV BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) международной базы данных института Лос-Аламос¹³.

Определение ЛУ ВИЧ-1

Выявление мутаций резистентности проводили с использованием базы данных Стенфордского университета HIVdb (v. 9.1), согласно которой каждой мутации и комбинации мутаций присваиваются баллы, характеризующие уровень прогностической ЛУ ВИЧ-1: потенциально низкий (10–14 баллов), низкий (15–29 баллов), средний (30–59 баллов) и высокий (более 60 баллов). ЛУ-вариантами вируса считали те, для которых были получены 15 и более баллов.

Оценка прогностической ЛУ ВИЧ-1 была проведена к:

- ингибиторам протеазы (ИП): атазанавиру (ATV), дарунавиру (DRV), фосампренавиру (FPV), индинавиру (IDV), лопинавиру (LPV), нелфинавиру (NFV), ритонавиру (RTV), саквинавиру (SQV), типранавиру (TPV);
- нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ): абакавиру (ABC), зидовудину (ZDV), ставудину (d4T), диданозину (ddI), эмтрицитабину (FTC), ламивудину (3TC), тенофовиру (TDF);
- ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ): доравирину (DOR), эфавирензу (EFV), этравирину (ETR), невирапину (NVP), рилпивирину (RPV).

Для оценки мутаций, значимых для надзора за передаваемой ЛУ ВИЧ-1 у пациентов без опыта АРТ, использовали список мутаций, значимых для надзора за передаваемой ЛУ ВИЧ-1 (Surveillance Drug Resistance Mutation, SDRM) 2009 г. [16].

Филогенетический анализ

Выравнивание НП ВИЧ-1 проводили с использованием онлайн-инструмента международной базы данных института Лос-Аламос методом HMMER.

Редактирование и обрезку выровненных НП выполняли с помощью программы «BioEdit 7.0.9.0».

Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия с bootstrap 100 и общей реверсивной моделью с инвариантными сайтами и гамма-распределением (G+I) в программе «MEGA6».

Определение молекулярных кластеров ВИЧ-1

Молекулярные кластеры ВИЧ-1 были выявлены с помощью программного обеспечения «Cluster Picker 1.2.3» [17] с порогом bootstrap 0,9 и порогом

⁹ URL: http://pssm.cfenet.ubc.ca/who_qc/

¹⁰ URL: <https://ruhiv.ru>

¹¹ URL: <https://hivdb.stanford.edu/>

¹² URL: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool>

¹³ URL: <https://www.hiv.lanl.gov>

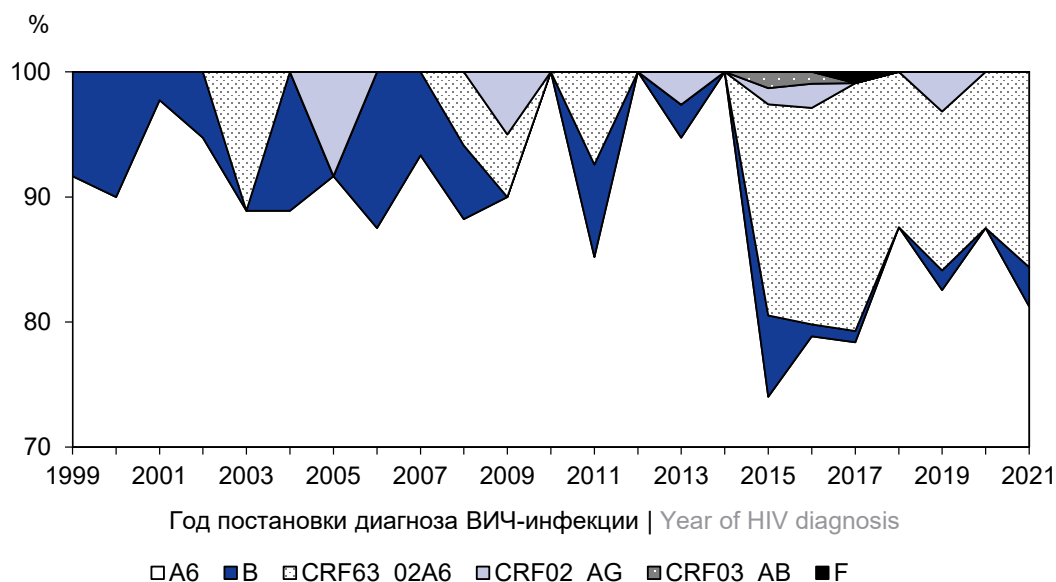


Рис. 1. Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 по году постановки диагноза «ВИЧ-инфекция».

Fig. 1. Distribution of HIV-1 genetic variants by year of diagnosis of HIV infection.

генетической дистанции 0,045 нуклеотидных замен на позицию (4,5%).

Визуализацию молекулярных кластеров проводили с помощью онлайн-инструмента «MicrobeTrace»¹⁴. Кластеры были классифицированы как большие, если состояли из 4 и более НП, а также как активные, если содержали хотя бы 1 НП от пациента с диагнозом «ВИЧ-инфекция», поставленным в 2019–2021 гг.

Статистический анализ

Полученные в работе данные статистически обрабатывали с помощью программы «Microsoft Excel» и онлайн-инструмента «GraphPad Prism». Статистическую значимость различий между количественными показателями оценивали с использованием двустороннего точного теста Фишера. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика пациентов

В исследование были включены 899 больных с ВИЧ-инфекцией, что составило 34,1% от выявленных ЛЖВ в исследуемом регионе по состоянию на конец 2021 г.¹⁵ На момент забора крови 354 (39,4%) пациента имели опыт приёма АРВП и 545 (60,6%) пациентов были АРТ-наивными.

Медиана возраста пациентов на момент забора крови для проведения исследования составила 37 (32–42) лет. Среди пациентов с опытом АРТ было 6 (1,7%) ВИЧ-инфицированных в возрасте менее 18 лет.

Путь передачи ВИЧ-1 был известен для 874 (97,2%) исследуемых пациентов. Основными путями передачи ВИЧ-1 являлись половой (507; 65,0%) и парентеральный при внутривенном введении наркотиков (283; 31,5%).

Преобладали пациенты мужского пола (512; 57,0%).

В табл. 1 представлена клинико-эпидемиологическая характеристика всех пациентов, включённых в исследование.

Генетические варианты ВИЧ-1

Доминирующим генетическим вариантом ВИЧ-1 был суб-субтип А6, он обнаружен у 85,7% ВИЧ-инфицированных. С высокой частотой выявлялась циркулирующая рекомбинантная форма (CRF) 63_02A6 (10,6%), распространённость которой увеличилась среди исследуемых пациентов, которым поставили диагноз «ВИЧ-инфекция», в 2015–2021 гг. (рис. 1). Остальные генетические варианты ВИЧ-1 встречались значительно реже: субтип В — 2,4%; CRF02_AG — 1,0%; CRF03_AB — 0,2%; субтип F — 0,1%.

ЛУ и мутации резистентности ВИЧ-1

Среди 545 пациентов без опыта АРТ ЛУ ВИЧ-1 хотя бы к одному АРВП была выявлена у 74 (13,6%) ВИЧ-инфицированных лиц: наиболее часто — к препаратам класса ННИОТ (11,4%), значительно реже — к ИП (2,8%) и НИОТ (0,7%).

¹⁴ URL: <https://microbetrace.cdc.gov>

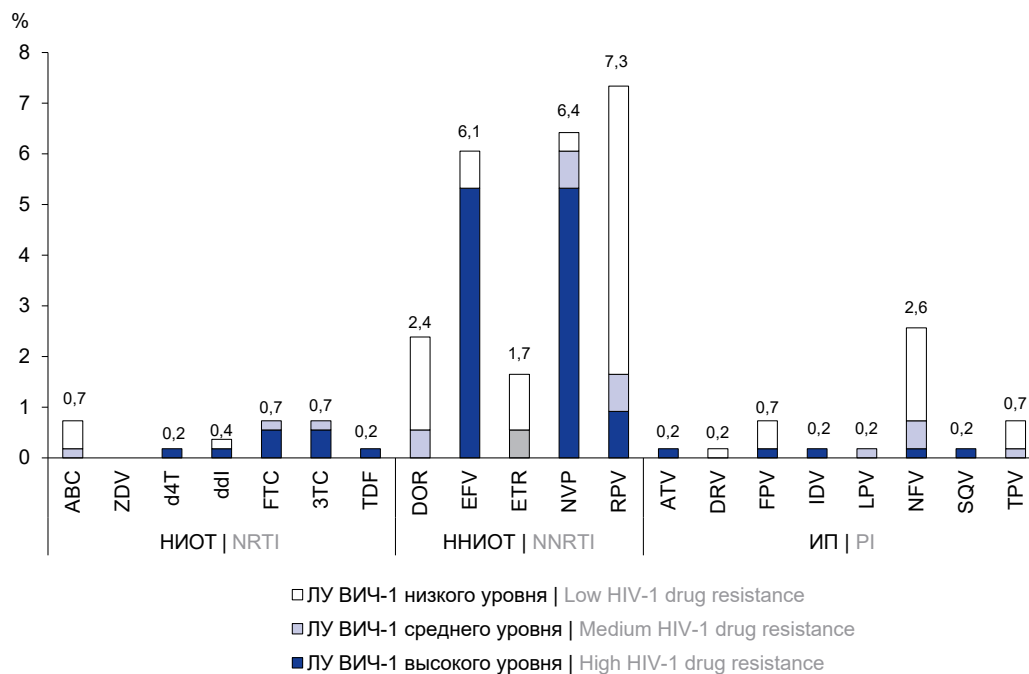
¹⁵ Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Информационный бюллетень № 46 «ВИЧ-инфекция». 2021. URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/05/Bulleten-46-VICH-infektsiya-za-2020-g.-.pdf> (дата обращения: 08.07.2024).

Таблица 1. Клинико-эпидемиологическая характеристика пациентов**Table 1.** Clinical and epidemiological characteristics of patients

Характеристика Characteristic	Пациенты с опытом АРТ ART-experienced patients	Пациенты без опыта АРТ ART-naïve patients	Все Total
Количество пациентов Number of patients	354	545	899
Возраст, лет, медиана (IQR) Age, years, median (IQR)	37 (33–42)	36 (31–42)	37 (32–42)
Пол, <i>n</i> (%) Sex, <i>n</i> (%)			
мужской male	196 (55,4)	316 (58,0)	512 (57,0)
женский female	158 (44,6)	229 (42,0)	387 (43,0)
Путь передачи, <i>n</i> (%) Route of transmission, <i>n</i> (%)			
половой (гетеросексуальный) sexual (heterosexual)	177 (50,0)	330 (60,6)	507 (56,4)
половой (гомосексуальный) sexual (homosexual)	1 (0,3)	6 (1,1)	7 (0,8)
половой (без уточнения) sexual (unspecified)	46 (13,0)	24 (4,4)	70 (7,8)
парентеральный (наркотический) parenteral (narcotic)	116 (32,8)	167 (30,6)	283 (31,5)
вертикальный mother-to-child	7 (2,0)	0	7 (0,8)
нет данных unknown	7 (2,0)	18 (3,3)	25 (2,8)
Вирусная нагрузка, log ₁₀ копий/мл, медиана (IQR) Viral load, log ₁₀ copies/mL, median (IQR)	4,2 (3,7–4,9)	4,6 (4,0–5,2)	4,5 (3,9–5,1)
Год забора крови, <i>n</i> (%) Sampling year, <i>n</i> (%)			
2016	22 (6,2)	0	22 (2,4)
2017	35 (9,9)	0	35 (3,9)
2018	139 (39,3)	341 (62,6)	480 (53,4)
2019	110 (31,1)	113 (20,7)	223 (24,8)
2020	6 (1,7)	0	6 (0,7)
2021	42 (11,9)	91 (16,7)	133 (14,8)

Среди класса ННИОТ ЛУ ВИЧ-1 была обнаружена чаще всего к RPV (7,3%), NVP (6,4%) и EFV (6,1%), причём к препаратам 1-го поколения преимущественно высокого уровня (рис. 2). Среди ИП

ЛУ ВИЧ-1 чаще всего была выявлена к NFV (2,6%). Среди препаратов класса НИОТ резистентность ВИЧ-1 была определена наиболее часто к ABC (0,7%), FTC (0,7%) и ЗТС (0,7%).

**Рис. 2.** Распространённость и уровень ЛУ ВИЧ-1 среди пациентов без опыта АРТ.**Fig. 2.** Prevalence and level of HIV-1 drug resistance among ART-naïve patients.

Преимущественно ЛУ ВИЧ-1 среди пациентов без опыта АРТ была обнаружена только к одному классу препаратов — ННИОТ (10,1%). Резистентность ВИЧ-1 только к ИП была обнаружена у 12 (2,2%) пациентов, ЛУ ВИЧ-1 только к препаратам класса НИОТ не выявлена. Мультирезистентность была обнаружена редко и только одновременно к двум классам АРВП: ИП + ННИОТ (0,6%) и НИОТ + ННИОТ (0,7%).

В результате анализа паттернов ЛУ ВИЧ-1 установлено, что хотя бы одна мутация резистентности, включая полиморфные мутации для суб-суб-типа А6 — *A62V* и *E138A*, была обнаружена у 273 (50,1%) ВИЧ-инфицированных. Наиболее распространёнными мутациями к классу ННИОТ являлись *K103N* (4,6%), *E138A* (4,2%), *G190S* (1,5%), *V179E* (1,3%) и *K101E* (1,1%), к классу НИОТ: *A62V* (39,4%). Остальные мутации, в том числе к классу ИП, встречались с частотой менее 1%.

SDRMs были выявлены у 6,8% пациентов без опыта АРТ, отмечалась тенденция к увеличению их распространённости. Так, у пациентов с датой забора крови в 2018, 2019 и 2021 гг. хотя бы одна надзорная мутация была выявлена в 5,9% (95% ДИ 3,8–8,9%), 6,2% (95% ДИ 2,8–12,4%) и 8,8% (95% ДИ 4,3–16,6%) случаев соответственно.

Полный перечень обнаруженных мутаций среди пациентов без опыта АРТ представлен в табл. 2.

Среди 354 пациентов с опытом АРТ ЛУ ВИЧ-1 хотя бы к одному АРВП была обнаружена в 52,0% случаев, наиболее часто — к препаратам класса

Таблица 2. Распространённость мутаций резистентности среди пациентов без опыта АРТ

Table 2. Prevalence of resistance mutations among ART-naïve patients

Класс АРВП ARV class	Мутации Mutations	Частота встречаемости, n (%) Mutation detection rate, n (%)
НИОТ NRTI	<i>E44D</i>	3 (0,6)
	<i>A62V</i>	215 (39,4)
	<i>K65R*</i>	1 (0,2)
	<i>M184I*</i>	1 (0,2)
	<i>M184V*</i>	2 (0,4)
ННИОТ NNRTI	<i>A98G</i>	1 (0,2)
	<i>K101E*</i>	6 (1,1)
	<i>K103N*</i>	25 (4,6)
	<i>V106I</i>	1 (0,2)
	<i>V108I</i>	3 (0,6)
	<i>E138A</i>	23 (4,2)
	<i>E138G</i>	5 (0,9)
	<i>E138K</i>	1 (0,2)
	<i>V179D</i>	3 (0,6)
	<i>V179E</i>	7 (1,3)
ИП PI	<i>V179T</i>	3 (0,6)
	<i>G190S*</i>	8 (1,5)
	<i>M46I*</i>	3 (0,6)
	<i>M46V</i>	2 (0,4)
	<i>M46L*</i>	1 (0,2)
	<i>I84V*</i>	1 (0,2)

Примечание. *Мутации из списка SDRM.
Note. *Mutations from the SDRM list.

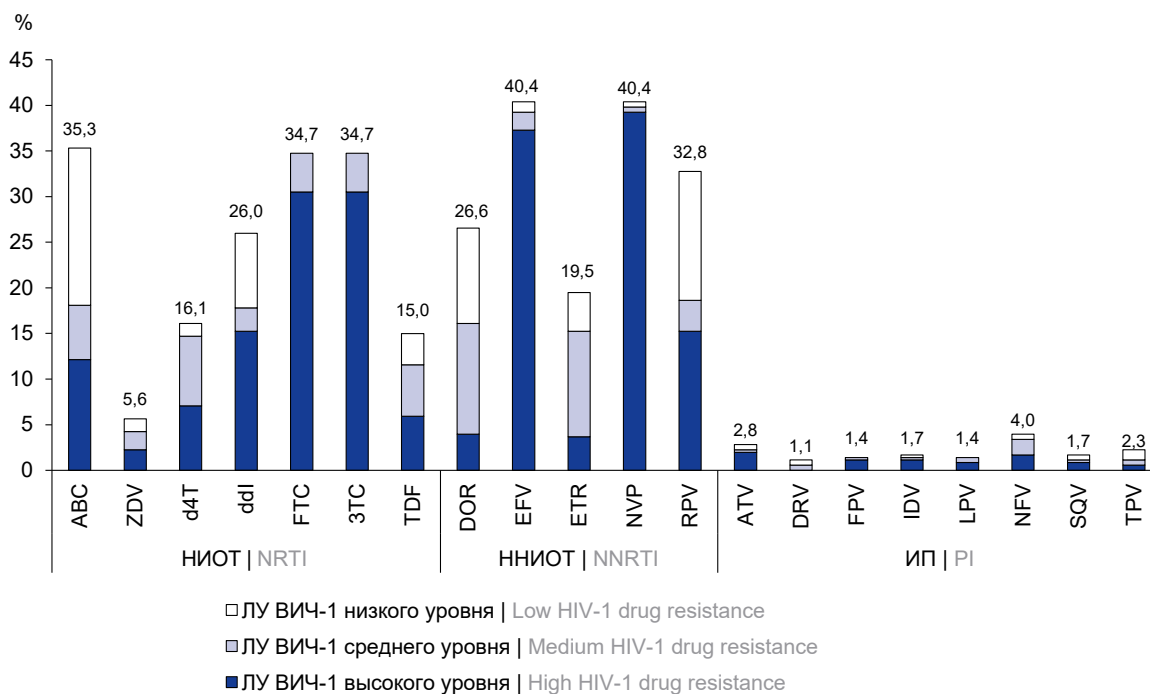


Рис. 3. Распространённость и уровень ЛУ ВИЧ-1 среди пациентов с опытом АРТ.
Fig. 3. Prevalence and level of HIV-1 drug resistance among ART-experienced patients.

ННИОТ (44,6%) и НИОТ (36,2%). ЛУ ВИЧ-1 к ИП была обнаружена редко, у 5,4% пациентов.

Среди класса ННИОТ ЛУ ВИЧ-1 была обнаружена чаще всего к NVP (40,4%), EFV (40,4%) и RPV (32,8%) (рис. 3). При этом к ННИОТ 1-го поколения (EFV и NVP) резистентность была преимущественно высокого уровня. Среди НИОТ ЛУ ВИЧ-1 наиболее часто была выявлена к ABC (35,3%), FTC (34,7%) и 3ТС (34,7%), преимущественно высокого уровня к первым 2 препаратам. ЛУ ко всем препаратам класса ИП не превышала 5% и чаще всего была обнаружена к NFV (4,0%).

ЛУ ВИЧ-1 у пациентов с опытом АРТ чаще всего, в 27,1% случаев, была обнаружена к двум классам препаратов (НИОТ + ННИОТ), а также только к препаратам класса ННИОТ в 14,1% случаев. Мультирезистентность к 3 классам препаратов (ИП + НИОТ + ННИОТ) была обнаружена редко, у 3,1% пациентов.

В результате анализа паттернов ЛУ ВИЧ-1 у пациентов с опытом АРТ мутации резистентности были обнаружены у 255 (72,0%) ВИЧ-инфицированных, включая полиморфные мутации. Наиболее часто встречающиеся мутации к ННИОТ — *G190S* (20,1%), *K103N* (12,7%), *K101E* (10,2%), *Y181C* (6,8%), *E138A* (6,2%), к НИОТ — *A62V* (38,4%), *M184V/I* (26,8%), *K65R* (10,5%), к ИП — *M46I* (2,5%). В табл. 3 представлен перечень выявленных мутаций резистентности среди пациентов с опытом АРТ.

Молекулярные кластеры ВИЧ-1

В результате анализа молекулярных кластеров установлено, что 243 из 899 НП ВИЧ-1 (27,1%) образовали 91 кластер. Внутри кластеров чаще были обнаружены НП ВИЧ-1 от пациентов без опыта АРТ (69,5% против 57,3%; $p = 0,0009$).

Распространённость ЛУ ВИЧ-1 внутри кластеров составила 20,2% (49/243) по сравнению с 42,7% (209/656) вне кластеров ($p = 0,0005$). При этом не отмечалось зависимости кластеризации НП ВИЧ-1 с ЛУ ВИЧ-1 от наличия у пациентов опыта АРТ или каких-либо других клинико-эпидемиологических характеристик.

Мутации резистентности (без учёта полиморфных мутаций для суб-субтипа А6 — *A62V*, *E138A*) обнаружены в 54 НП ВИЧ-1 в 33 кластерах.

Проанализированы особенности кластеризации НП ВИЧ-1 с мутациями, встречающимися с частотой более 1,0% в исследуемой выборке (табл. 4). Наиболее распространёнными мутациями в обнаруженных кластерах были *K103N* (6,2%), *V179E* (4,1%), *G190S* (4,9%) и *M184V* (4,9%). При этом мутация *V179E* достоверно чаще встречалась в кластерах, а мутации *M184V*, *K101E* и *G190S*, напротив, реже, чем среди всех исследуемых пациентов.

Передаваемые мутации, т. е. такие, которые встречались хотя бы в 2 НП ВИЧ-1 в кластере, были

обнаружены в 9 кластерах в 27 НП (рис. 4). Профиль передаваемых мутаций был ограничен и включал мутации к ННИОТ (*K103N*, *V179E/T*, *G190S*, *Y181C*), НИОТ (*M184V*, *K65R*) и ИП (*L33F*).

Внутри кластеров была определена эффективность передачи мутаций резистентности как отношение количества передаваемых мутаций в кластерах ко всем мутациям в кластерах. Наибольшая эффективность передачи (50% и выше) установлена у мутаций *K103N* (10/15; 66,7%), *V179E/T* (11/12; 91,7%), *Y181C* (2/4; 50,0%) и *G190S* (6/12; 50,0%).

На основании даты постановки диагноза «ВИЧ-инфекция» были определены предполагаемые источники передаваемых мутаций ВИЧ-1, ко-

Таблица 3. Распространённость мутаций резистентности* среди пациентов с опытом АРТ

Table 3. Prevalence of resistance mutations* among ART-experienced patients

Класс АРВП ARV class	Мутации* Mutations*	Частота встречаемости, n (%) Mutation detection rate, n (%)
НИОТ NRTI	<i>A62V</i>	136 (38,4)
	<i>K65R</i>	37 (10,5)
	<i>D67N</i>	13 (3,7)
	<i>K70R</i>	10 (2,8)
	<i>K70E</i>	4 (1,1)
	<i>L74I</i>	6 (1,7)
	<i>L74V</i>	13 (3,7)
	<i>M184I</i>	19 (5,4)
	<i>M184V</i>	76 (21,5)
	<i>T215Y</i>	4 (1,1)
	<i>K219E</i>	4 (1,1)
	<i>K219Q</i>	7 (2,0)
ННИОТ NNRTI	<i>L100I</i>	4 (1,1)
	<i>K101E</i>	36 (10,2)
	<i>K103N</i>	45 (12,7)
	<i>V106I</i>	8 (2,3)
	<i>V108I</i>	7 (2,0)
	<i>E138A</i>	22 (6,2)
	<i>E138G</i>	8 (2,3)
	<i>V179D</i>	6 (1,7)
	<i>V179E</i>	7 (2,0)
	<i>V179T</i>	4 (1,1)
	<i>Y181C</i>	24 (6,8)
	<i>G190S</i>	71 (20,1)
ИП PI	<i>H221Y</i>	5 (1,4)
	<i>P225H</i>	9 (2,5)
	<i>M46I</i>	9 (2,5)
	<i>I50L</i>	4 (1,1)

Примечание. *Представлены мутации с частотой распространённости не менее 1%.

Note. *Mutations with a prevalence of at least 1% are represented.

Таблица 4. Распространённость мутаций ЛУ ВИЧ-1 внутри кластеров
Table 4. Prevalence of HIV-1 DR mutations within clusters

Класс АРВП ARV class	Мутации Mutations	Распространённость среди всех исследуемых пациентов Prevalence among all study patients (n = 899), %	Распространённость внутри кластеров Prevalence within clusters (n = 243), %	p*
НИОТ NRTI	<i>K65R</i>	4,2	2,1	0,0604
	<i>D67N</i>	1,4	0,4	0,2039
	<i>K70R</i>	1,1	0	0,0701
	<i>M184I</i>	2,2	2,1	1
	<i>M184V</i>	8,7	4,9	0,0159
ННИОТ NNRTI	<i>K101E</i>	4,7	2,1	0,0211
	<i>K103N</i>	7,8	6,2	0,3270
	<i>V106I</i>	1,0	1,2	0,7091
	<i>V108I</i>	1,1	1,2	0,7349
	<i>E138G</i>	1,4	1,6	0,7568
	<i>V179D</i>	1,0	1,6	0,2625
	<i>V179E</i>	1,6	4,1	0,0006
	<i>Y181C</i>	2,7	1,6	0,3515
	<i>G190S</i>	8,8	4,9	0,0117
	<i>P225H</i>	1,0	0	0,1233
ИП PI	<i>M46I</i>	1,3	0,4	0,1975

Примечание. *Жирным шрифтом выделены достоверные различия (p < 0,05).
Note. *Statistically significant differences are highlighted in bold (p < 0.05).

торами в 6/9 кластерах (66,7%) были пациенты с опытом приёма АРВП.

Во всех кластерах пациенты с более ранней датой постановки диагноза передавали полный профиль мутаций, за исключением одного кластера, в котором из профиля *M184V* + *K103N* передалась только *K103N*.

Большинство кластеров (7/9) с передаваемыми мутациями ВИЧ-1 были небольшими и неактивными. В больших активных кластерах были выявлены только мутации *K103N* (1 кластер) и *V179E* (1 кластер).

Обсуждение

На фоне многолетнего опыта приёма АРВП и возрастающего количества пациентов на АРТ распространённость ЛУ-вариантов ВИЧ в России с каждым годом увеличивается [18], что является основанием для увеличения охвата ВИЧ-инфицированных лиц тестированием на ЛУ ВИЧ-1. Благодаря совершенствованию технологий секвенирования и усилению национальной базы данных устойчивости ВИЧ к АРВП [19] накапливается значительный объём генетических и эпидемиологических данных, что вместе с развитием биоинформатических методов исследования позволяет использовать их для более глубокого изучения особенностей распространения ВИЧ-1.

В настоящем исследовании на примере пилотного региона России впервые в стране были проде-

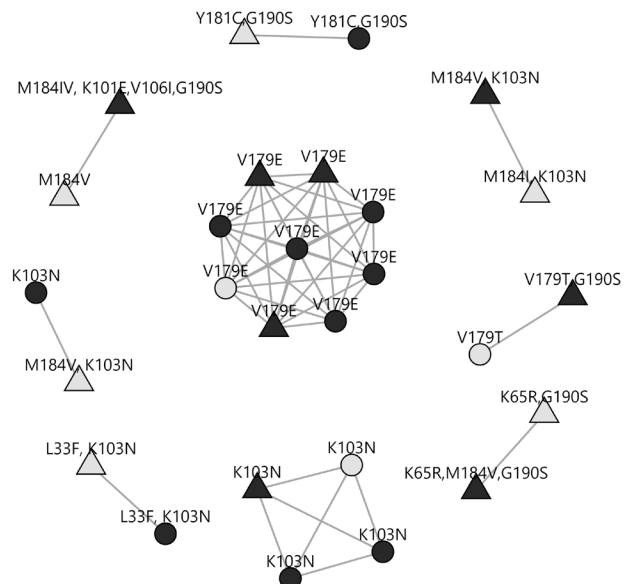


Рис. 4. Кластеры с передаваемыми мутациями резистентности.

Треугольником обозначены НП ВИЧ-1 от пациентов с опытом АРТ, кругом — НП ВИЧ-1 от пациентов без опыта АРТ. Светло-серым цветом выделены НП ВИЧ-1 от пациентов с наиболее ранней датой диагноза «ВИЧ-инфекция» в кластере.

Fig. 4. Clusters with transmitted resistance mutations.

The triangle indicates HIV-1 nucleotide sequences from ART-experienced patients, and the circle indicates HIV-1 nucleotide sequences from ART-naïve patients. HIV-1 nucleotide sequences from patients with the earliest date of diagnosis of HIV infection in the cluster are marked in light grey.

монстрированы возможности нового направления, геномного эпидемиологического надзора, в части распространения резистентных вариантов ВИЧ-1. Впервые для одного региона России был получен высокий охват секвенированием ВИЧ-1 ЛЖВ, который составил 34,1% по состоянию на конец 2021 г.¹⁶, что позволяет получить достоверные результаты исследования.

В результате оценки генетического разнообразия ВИЧ-1 в исследуемом регионе обнаружены 5 генетических вариантов (суб-субтип А6, субтип В, CRF63_02A6, CRF02_AG, CRF03_A6B), характерных для генетического ландшафта России [20], а также нетипичный для российской эпидемии субтип F, вероятно, являющийся следствием завозного случая ВИЧ-инфекции. Обнаруженное увеличение доли CRF63_02A6 среди пациентов с диагнозом, поставленным в период с 2015 по 2021 г., отражает общую тенденцию в стране [21, 22].

В результате анализа ЛУ ВИЧ-1 установлено, что устойчивость ВИЧ-1 хотя бы к одному АРВП была выявлена у 13,6% пациентов без опыта АРТ, чаще всего к препаратам класса ННИОТ (11,4%): RPV (7,3%), NVP (6,4%) и EFV (6,1%), что соответствует данным, полученным по России в целом [21].

Распространённость ЛУ ВИЧ-1 у исследуемых пациентов с опытом АРТ составила 52,0%, наиболее часто — к тем же препаратам класса ННИОТ (44,6%): NVP (40,4%), EFV (40,4%) и RPV (32,8%), а также к НИОТ (36,2%): ABC (35,3%), FTC (34,7%) и ЗТС (34,7%). Описанный уровень распространённости ЛУ ВИЧ-1 у пациентов с опытом АРТ в России значительно варьирует от 50% [23] до 82,4% [24], что отражает правильность назначения генотипирующего теста. В настоящем исследовании относительно низкий уровень ЛУ ВИЧ-1 связан с тем, что не у всех пациентов был установлен вирусологический неуспех применяемой АРТ.

Следует отметить, что ЛУ ВИЧ-1 высокого уровня среди всех пациентов, независимо от наличия опыта АРТ, наиболее часто была установлена к препаратам класса ННИОТ (NVP, EFV) и НИОТ (FTC и ЗТС), что объясняется их широким применением и низким генетическим барьером к развитию ЛУ ВИЧ-1 [25].

В исследуемый период в регионе наиболее часто применяемая схема АРТ 1-й линии включала TDF, ЗТС и EFV. Согласно результатам настоящего исследования, первичная резистентность ВИЧ-1 к применяемой нуклеозидной основе не превышала 1%, а резистентность к EFV составила 6,1%, что

позволяет рекомендовать замену третьего компонента схемы в соответствии с национальными клиническими рекомендациями по лечению ВИЧ-инфекции¹⁷.

Наиболее часто встречаемыми мутациями (без учёта полиморфных мутаций для суб-субтипа А6 — *A62V* и *E138A*) среди пациентов без опыта АРТ были *K101E*, *K103N*, *V179E* и *G190S* к ННИОТ, среди пациентов с опытом АРТ — *K101E*, *K103N*, *V179E*, *Y181C*, *G190S* к ННИОТ и *M184V/I*, *K65R* к НИОТ. ЛУ ВИЧ-1 и мутации резистентности к препаратам класса ИП среди исследуемых пациентов встречались редко.

Распространённость мутаций, значимых для эпидемиологического надзора за передаваемой ЛУ ВИЧ-1, в Орловской области составила 6,8%, что соответствует среднему уровню по России [18]. Мультирезистентность к трем классам АРВП (ИП + НИОТ + ННИОТ) была выявлена только у пациентов с опытом АРТ в 3,1% случаев. Таким образом, можно заключить, что уровень ЛУ ВИЧ-1 в исследуемом регионе умеренный, а выявленные паттерны ЛУ ВИЧ-1 соответствуют применяемым схемам АРТ и являются типичными для России.

Оценка уровня и структуры ЛУ ВИЧ-1 предоставляет важную информацию о том, какие препараты эффективны на момент исследования, однако не позволяет определить особенности распространения ЛУ-вариантов или спрогнозировать, какие препараты будут эффективны в будущем. Для более глубокого анализа в настоящем исследовании был применён один из инструментов геномного эпидемиологического надзора — метод анализа молекулярных кластеров — в отношении распространения ЛУ ВИЧ-1.

В результате анализа установлено, что молекулярные кластеры чаще формировали ИП ВИЧ-1 от пациентов без опыта АРТ, что свидетельствует о том, что они являлись основными источниками инфицирования ВИЧ в регионе, и что позволяет предположить отсутствие высоких рисков передачи ЛУ-вариантов ВИЧ-1 из-за относительно низкой распространённости первичной ЛУ ВИЧ-1.

Кроме того, было обнаружено, что ЛУ-варианты вируса как от пациентов без опыта АРТ, так и от пациентов с опытом АРТ реже попадали в молекулярные кластеры, что, вероятно, объясняется тем, что у большинства из них значимо снижен фитнес [26].

Несмотря на то что передача ВИЧ-инфекции в Орловской области происходила в основном от пациентов без опыта АРТ, источниками резистентных вариантов ВИЧ предположительно являлись пациенты с опытом АРТ. Интересно отметить, что в зарубежных исследованиях описано, что источником

¹⁶ Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Информационный бюллетень № 46 «ВИЧ-инфекция». 2021. URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/05/Byulleten-46-VICH-infektsiya-za-2020-g.-.pdf>. (дата обращения: 08.07.2024).

¹⁷ Клинические рекомендации «ВИЧ-инфекция у взрослых» (утв. Министерством здравоохранения РФ). М.; 2020.

ЛУ-вариантов ВИЧ-1 являлись, напротив, пациенты без опыта АРТ [27–29], что, вероятно, связано с более высокими показателями эффективности АРТ в странах.

В результате оценки передаваемых мутаций ЛУ ВИЧ-1 установлено, что профиль ограничен 9 мутациями: *K103N*, *V179E/T*, *Y181C*, *G190S* к ННИОТ; *K65R*, *M184I/V* к НИОТ; *L33F* к ИП, что позволяет прогнозировать, какие препараты будут малоэффективны в будущем. Так, наиболее часто передаваемой мутацией была *K103N*, которая ассоциирована с возникновением резистентности ВИЧ-1 к NVP и EFV. Результаты других исследований также показали, что данная мутация передаётся чаще других [30, 31], что связано с тем, что вирусы с этой мутацией и «дикие» имеют схожий фитнес, а также с тем, что данная мутация может персистировать в организме пациента длительное время [32, 33]. Важно также отметить, что наличие данной мутации у пациентов, начинающих лечение по схеме TDF + 3ТС + EFV, связано с повышенными рисками вирусологического неуспеха [34].

Мутации *V179E/T*, которые также встречались с высокой частотой в кластерах, связаны со снижением ответа на лечение ННИОТ (за исключением DOR), но, как правило, не приводят к возникновению вирусологической неудачи лечения [35]. Однако при наличии этих мутаций не рекомендуется назначать схему, содержащую EFV, если у пациента высокая вирусная нагрузка на старте лечения [36].

Следующая по распространённости в кластерах передаваемая мутация — *G190S* — ассоциирована с 200-кратным и 130-кратным снижением восприимчивости ВИЧ-1 к NVP и EFV соответственно и часто встречается у вирусов суб-субтипа А6 ввиду предрасположенности к ней [37]. При этом отмечается, что фитнес вируса, содержащего данную мутацию, снижен [38].

Мутация *Y181C* снижает восприимчивость вируса ко всем ННИОТ, особенно к NVP, и практически не ухудшает фитнес вируса [39].

Передаваемые мутации к НИОТ *M184I/V*, обнаруженные в кластерах, ассоциированы с высоким уровнем устойчивости ВИЧ-1 к 3ТС, FTC и низким — к ABC, при этом повышают чувствительность к d4T, ZDV и TDF, что позволяет сохранять в схемах 3ТС и FTC при их появлении. В зарубежных исследованиях описано, что данные мутации часто передаются от пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ [40], а также длительное время сохраняются в резервуарах ВИЧ [41].

Мутация *K65R* связана со снижением восприимчивости ко всем НИОТ, кроме ZDV, к которому она, наоборот, повышает чувствительность вируса. Описано, что мутации *M184I/V* и *K65R* значимо снижают фитнес вируса [42, 43].

Единственная мутация к ИП — *L33F*, которая встречалась в кластерах, является дополнительной и лишь незначительно влияет на восприимчивость вируса к АРВП.

Присутствие описанных выше мутаций в молекулярных кластерах свидетельствует об их активной передаче, однако наибольшую опасность представляют те мутации, которые имеют ещё и высокую эффективность передачи внутри этих кластеров. В результате оценки эффективности установлено, что такими мутациями являются *K103N*, *V179E/T*, *Y181C*, *G190S*, которые вызывают устойчивость вируса к ННИОТ 1-го поколения — EFV и NVP.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что риск увеличения передачи ЛУ ВИЧ-1 в Орловской области отсутствует, о чём свидетельствуют высокая степень кластеризации пациентов без опыта АРТ, имеющих относительно невысокий уровень первичной резистентности, низкая степень кластеризации ЛУ-вариантов ВИЧ, а также тот факт, что передача мутаций была обнаружена в основном в небольших и неактивных кластерах. Установленная в настоящем исследовании быстрая и эффективная передача мутаций, ассоциированных с устойчивостью вируса к ННИОТ 1-го поколения, позволяет рекомендовать ограничить их использование для предотвращения распространения ЛУ-вариантов ВИЧ-1 в регионе и повышения эффективности АРТ.

Заключение

Результаты анализа молекулярных кластеров предоставляют информацию об особенностях распространения ЛУ-вариантов ВИЧ-1, в частности о динамике передачи ЛУ ВИЧ-1, источниках резистентных вариантов вируса, эффективности передачи мутаций резистентности, что позволяет рекомендовать данный метод к использованию в рамках геномного эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией в России для разработки стратегий профилактики предотвращения передачи ЛУ-вариантов вируса и повышения эффективности лечения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008;372(9635):293–9.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61113-7)
2. Lima V.D., Lourenço L., Yip B., et al. AIDS incidence and AIDS-related mortality in British Columbia, Canada, between 1981 and 2013: a retrospective study. *Lancet HIV*. 2015;2(3):e92–7.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00017-X)
3. Cohen M.S., Chen Y.Q., McCauley M., et al. Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission. *N. Engl. J. Med.* 2016;375(9):830–9.
DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600693>
4. Rodger A.J., Cambiano V., Bruun T., et al. Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples

- with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet*. 2019;393(10189):2428–38. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30418-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30418-0)
5. Hamers R.L., Schuurman R., Sigaloff K.C., et al. Effect of pre-treatment HIV-1 drug resistance on immunological, virological, and drug-resistance outcomes of first-line antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa: a multicentre cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2012;12(4):307–17. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70255-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70255-9)
 6. Kiekens A., Dierckx de Casterlé B., Pellizzer G., et al. Exploring the mechanisms behind HIV drug resistance in sub-Saharan Africa: conceptual mapping of a complex adaptive system based on multi-disciplinary expert insights. *BMC Public Health*. 2022;22(1):455. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-022-12738-4>
 7. Phillips A.N., Stover J., Cambiano V., et al. Impact of HIV drug resistance on HIV/AIDS-associated mortality, new infections, and antiretroviral therapy program costs in sub-Saharan Africa. *J. Infect. Dis.* 2017;215(9):1362–5. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix089>
 8. Cambiano V., Bertagnolio S., Jordan M.R., et al. Transmission of drug resistant HIV and its potential impact on mortality and treatment outcomes in resource-limited settings. *J. Infect. Dis.* 2013;207(Suppl. 2):S57–62. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit111>
 9. Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Хафизов К.Ф. и др. Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2024;101(2):163–72. Akimkin V.G., Semenenko T.A., Khafizov K.F., et al. Genomic surveillance strategy. Problems and perspectives. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(2):163–72. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-507> EDN: <https://elibrary.ru/mymnik>
 10. Wertheim J.O., Kosakovsky Pond S.L., Forgiione L.A., et al. Social and genetic networks of HIV-1 transmission in New York city. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006000. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006000>
 11. Oster A.M., Lyss S.B., McClung R.P., et al. HIV cluster and outbreak detection and response: the science and experience. *Am. J. Prev. Med.* 2021;61(5 Suppl. 1):S130–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2021.05.029>
 12. Fauci A.S., Redfield R.R., Sigounas G., et al. Ending the HIV epidemic: A plan for the United States. *JAMA*. 2019;321(9):844–5. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2019.1343>
 13. Novitsky V., Moyo S., Lei Q., et al. Impact of sampling density on the extent of HIV clustering. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014;30(12):1226–35. DOI: <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0173>
 14. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
 15. Fedonin G.G., Fantin Y.S., Favorov A.V., et al. VirGenA: a reference-based assembler for variable viral genomes. *Brief. Bioinform.* 2019;20(1):15–25. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bbx079>
 16. Bennett D.E., Camacho R.J., Otelea D., et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 2009;4(3):e4724. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004724>
 17. Ragonnet-Cronin M., Hodcroft E., Hué S., et al. Automated analysis of phylogenetic clusters. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:317. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-317>
 18. Kireev D., Kirichenko A., Lebedev A., et al. Alarming rise of primary HIV drug resistance in major regions of Russia. *Curr. HIV Res.* 2023;21(6):347–53. DOI: <https://doi.org/10.2174/011570162X271430231201075335>
 19. Киреев Д.Е., Кириченко А.А., Лопатухин А.Э. и др. Российская база данных лекарственной устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2023;100(2):219–27. Kireev D.E., Kirichenko A.A., Lopatukhin A.E., et al. The Russian database of HIV antiretroviral drug resistance. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(2):219–27. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-345> EDN: <https://elibrary.ru/rwawu>
 20. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. *Терапевтический архив*. 2017;89(11):44–9. Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015. *Therapeutic Archive*. 2017;89(11):44–9. DOI: <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49> EDN: <https://elibrary.ru/zwosol>
 21. Kirichenko A., Kireev D., Lapovok I., et al. HIV-1 drug resistance among treatment-naïve patients in Russia: analysis of the national database, 2006–2022. *Viruses*. 2023;15(4):991. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15040991>
 22. Пасечник О.А., Блох А.И. Распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 в регионах Российской Федерации и стран СНГ: систематический обзор и метаанализ. *Инфекция и иммунитет*. 2018;8(2):127–38. Pasechnik O.A., Blokh A.I. The prevalence of HIV recombinant forms in Russia and countries of the CIS: systematic review and metaanalysis. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;8(2):127–38. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-127-138> EDN: <https://elibrary.ru/xshjlf>
 23. Ozhmegova E., Lebedev A., Antonova A., et al. Prevalence of HIV drug resistance at antiretroviral treatment failure across regions of Russia. *HIV Med.* 2024;25(7):862–72. DOI: <https://doi.org/10.1111/hiv.13642>
 24. Кириченко А.А., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В. и др. Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в России (2013–2021 гг.). *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2021;11(3):53–62. Kirichenko A.A., Kireev D.E., Shlykova A.V., et al. HIV-1 drug resistance in patients with virological inefficiency on art in Russia in 2013–2021. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2021;11(3):53–62. DOI: <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.3.53-62> EDN: <https://elibrary.ru/uqiuni>
 25. Clutter D.S., Jordan M.R., Bertagnolio S., et al. HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect. Genet. Evol.* 2016;46:292–307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>
 26. Geretti A.M., ed. *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice*. London: Mediscript; 2006.
 27. Drescher S.M., von Wyl V., Yang W.L., et al. Treatment-naïve individuals are the major source of transmitted HIV-1 drug resistance in men who have sex with men in the Swiss HIV Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* 2014;58(2):285–94. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cit694>
 28. Paraskevis D., Kostaki E., Magiorkinis G., et al. Prevalence of drug resistance among HIV-1 treatment-naïve patients in Greece during 2003–2015: Transmitted drug resistance is due to onward transmissions. *Infect. Genet. Evol.* 2017;54:183–91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.003>
 29. Mbisa J.L., Fearnhill E., Dunn D.T., et al. Evidence of self-sustaining drug resistant HIV-1 lineages among untreated patients in the United Kingdom. *Clin. Infect. Dis.* 2015;61(5):829–36. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/civ393>
 30. Eshleman S.H., Jones D., Galovich J., et al. Phenotypic drug resistance patterns in subtype A HIV-1 clones with nonnucleoside reverse transcriptase resistance mutations. *AIDS Res. Hum.*

- Retroviruses*. 2006;22(3):289-293.
DOI: <https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.289>
31. Rhee S.Y., Tzou P.L., Shafer R.W. Temporal trends in HIV-1 mutations used for the surveillance of transmitted drug resistance. *Viruses*. 2021;13(5):879.
DOI: <https://doi.org/10.3390/v13050879>
32. Kühnert D., Kouyos R., Shirreff G., et al. Quantifying the fitness cost of HIV-1 drug resistance mutations through phylodynamics. *PLoS Pathog*. 2018;14(2):e1006895.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006895>
33. Wertheim J.O., Oster A.M., Johnson J.A., et al. Transmission fitness of drug-resistant HIV revealed in a surveillance system transmission network. *Virus Evol*. 2017;3(1):vex008.
DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/vex008>
34. Bertagnolio S., Hermans L., Jordan M.R., et al. Clinical impact of pretreatment human immunodeficiency virus drug resistance in people initiating nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect. Dis*. 2021;224(3):377-88.
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa683>
35. Mackie N.E., Dunn D.T., Dolling D., et al. The impact of HIV-1 reverse transcriptase polymorphisms on responses to first-line nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapy in HIV-1-infected adults. *AIDS*. 2013;27(14):2245-53.
DOI: <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283636179>
36. Wang Z., Zhang M., Wang J., et al. Efficacy of efavirenz-based regimen in antiretroviral-naïve patients with HIV-1 V179D/E mutations in Shanghai, China. *Infect. Dis. Ther*. 2023;12(1):245-55. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00723-8>
37. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., et al. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS*. 2014;28(17):F1-8.
DOI: <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000485>
38. Wang J., Dykes C., Domaol R.A., et al. The HIV-1 reverse transcriptase mutants G190S and G190A, which confer resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, demonstrate reductions in RNase H activity and DNA synthesis from tRNA(Lys, 3) that correlate with reductions in replication efficiency. *Virology*. 2006;348(2):462-74.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.014>
39. Hu Z., Kuritzkes D.R. Altered viral fitness and drug susceptibility in HIV-1 carrying mutations that confer resistance to non-nucleoside reverse transcriptase and integrase strand transfer inhibitors. *J. Virol*. 2014;88(16):9268-76.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00695-14>
40. Wainberg M.A., Moisi D., Oliveira M., et al. Transmission dynamics of the M184V drug resistance mutation in primary HIV infection. *J. Antimicrob. Chemother*. 2011;66(10):2346-9.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/ckr291>
41. Teysou E., Soulie C., Fauchois A., et al. The RT M184V resistance mutation clearance in the reservoir is mainly related to CD4 nadir and viral load zenith independently of therapeutic regimen type. *J. Antimicrob. Chemother*. 2024;79(7):1673-6.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkae164>
42. Pao D., Andrady U., Clarke J., et al. Long-term persistence of primary genotypic resistance after HIV-1 seroconversion. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2004;37(5):1570-3.
DOI: <https://doi.org/10.1097/00126334-200412150-00006>
43. Castro H., Pillay D., Cane P., et al. Persistence of HIV-1 transmitted drug resistance mutations. *J. Infect. Dis*. 2013;208(9):1459-63. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit345>

Информация об авторах

Кириченко Алина Алексеевна[✉] — к. м. н., с. н. с. лаб. диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, kirichenko@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

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

Сидорина Юлия Николаевна — зав. отделением профилактики, врач-эпидемиолог Орловского центра СПИД, Орел, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-0888-113X>

Абашина Наталья Дмитриевна — заместитель главного врача по эпидемиологической, профилактической и организационно-методической работе Орловского центра СПИД, Орел, Россия, <https://orcid.org/0009-0007-5078-8026>

Брусенцева Елена Евгеньевна — врач-инфекционист Орловского центра СПИД, Орел, Россия, <https://orcid.org/0009-0008-8358-6145>

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

Участие авторов: Кириченко А.А. — подбор и анализ литературы, анализ данных, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Киреев Д.Е., Акимкин В.Г. — концепция и дизайн исследования, редактирование; Сидорина Ю.Н., Абашина Н.Д., Брусенцева Е.Е. — сбор и обработка биоматериала, 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 19.07.2024;
принята к публикации 20.09.2024;
опубликована 30.10.2024

Information about the authors

Alina A. Kirichenko[✉] — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, kirichenko@cmd.su, <https://orcid.org/0000-0002-7116-0138>

Dmitry E. Kireev — Cand. Sci. (Biol.), Head, HIV diagnostic and molecular epidemiology laboratory, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Yulia N. Sidorina — Head, Prevention department, epidemiologist, Oryol AIDS Center, Oryol, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-0888-113X>

Natalia D. Abashina — Deputy Chief physician for epidemiological, preventive and organizational and methodological work, Oryol AIDS Center, Oryol, Russia, <https://orcid.org/0009-0007-5078-8026>

Elena E. Brusentseva — infectious disease physician, Oryol AIDS Center, Oryol, Russia, <https://orcid.org/0009-0008-8358-6145>

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

Author contribution: Kirichenko A.A. — literature selection and analysis, data analysis, statistical processing, writing, editing; Kireev D.E., Akimkin V.G. — study concept and design, editing; Sidorina Yu.N., Abashina N.D., Brusentseva E.E. — collection and processing of biomaterial, editing. All authors made significant contributions to the search and analytical work, and preparation of the article, read and approved final version before publication.

The article was submitted 19.07.2024;
accepted for publication 20.09.2024;
published 30.10.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-573>



Исследование тропизма и биораспределения рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа *in vitro* и *in vivo*

Вавилова И.В.[✉], Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О.,
Воронина Д.В., Голдовская П.П., Зрелкин Д.И., Джаруллаева А.Ш.,
Должикова И.В., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Рекомбинантные аденовирусы (rAd) широко используются для разработки вакцин против ряда инфекционных заболеваний. Несмотря на большое количество клинических исследований, на сегодняшний день только несколько серотипов аденовирусов человека (5-й и 26-й серотипы) и обезьян (изолят Y25) на постоянной основе применяются для создания вакцинных препаратов. Различные серотипы rAd отличаются тропностью к клеткам, что играет ключевую роль в их способности к индукции иммунного ответа.

Цель работы — изучить клеточный тропизм *in vitro* и биораспределение *in vivo* rAd обезьян 25-го серотипа (SAd25) в сравнении с аденовирусами человека 5-го и 26-го серотипов.

Материалы и методы. Эффективность трансдукции *in vitro* оценивали на 15 клеточных линиях с использованием rAd, экспрессирующих репортерный ген *EGFP*. Биораспределение и биолюминесцентную визуализацию *in vivo* оценивали на мышах BALB/c с использованием rAd, экспрессирующих репортерный ген люциферазы. Острую токсичность SAd25 оценивали на мышах и крысах при внутримышечном и внутривенном введении.

Результаты. SAd25 эффективно трансдуцирует всю панель клеточных линий, при этом обнаружена более высокая тропность к клеткам глиобластомы человека (GL-6) по сравнению с двумя другими исследованными rAd. В экспериментах *in vivo* показано, что rAd в основном локализуется в месте введения, экспрессия трансгена сохраняется в течение 21 дня. В экспериментах по оценке острой токсичности SAd25 животные хорошо переносили введение препарата, гибель животных не зафиксирована, токсические эффекты не обнаружены.

Заключение. Новая платформа на основе SAd25 не уступает уже существующим и хорошо зарекомендовавшим себя системам доставки на основе аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов. Благодаря высокому уровню трансдукции и благоприятному профилю безопасности SAd25 может предложить ряд преимуществ для разработки вакцин против новых инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: аденовирусный вектор, аденовирус человека, аденовирус обезьян, тропизм, биораспределение, острая токсичность

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 30 от 28.10.2022).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка технологической платформы для создания рекомбинантных, в том числе живых вакцин для профилактики инфекционных болезней».

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

Для цитирования: Вавилова И.В., Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Зрелкин Д.И., Джаруллаева А.Ш., Должикова И.В., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Исследование тропизма и биораспределения рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа *in vitro* и *in vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):594–605.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-573>
EDN: <https://www.elibrary.ru/aspimgu>

In vitro and *in vivo* tropism and biodistribution of recombinant simian adenovirus type 25

Irina V. Vavilova[✉], Tatiana A. Ozharovskaia, Olga V. Zubkova, Olga Popova, Daria V. Voronina, Polina P. Goldovskaya, Denis I. Zrelkin, Alina Sh. Dzharullaeva, Inna V. Dolzhikova, Dmitry V. Shcheblyakov, Denis Yu. Logunov, Alexander L. Gintsburg

Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Recombinant adenoviruses are widely used in the development of vaccines for a variety of infectious diseases. Despite numerous clinical studies, only a few types of human (types 5 and 26) and simian (isolate Y25) adenoviruses are currently used to produce vaccine formulations. Different types of adenoviruses vary in their cellular tropism, which plays a key role in their ability to elicit an immune response.

The **aim** of this study was to investigate the cellular tropism of the simian adenovirus type 25 *in vitro* and its biodistribution *in vivo* in comparison with human adenoviruses types 5 and 26.

Materials and methods. The efficiency of *in vitro* transduction was evaluated on 15 different cell lines using recombinant adenovirus vectors expressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) reporter gene. *In vivo* biodistribution and bioluminescence imaging were evaluated in BALB/c mice after administration of recombinant adenoviral vectors encoding the luciferase reporter gene. The acute toxicity of a recombinant simian adenovirus type 25 vector was assessed in mice and rats following intramuscular or intravenous administration.

Results. Recombinant simian adenovirus effectively transduces a wide range of cells. At the same time, a higher tropism to human glioblastoma cells (GL-6) was found compared to the other two studied adenoviruses. *In vivo* experiments have shown that recombinant adenoviruses are mainly localized at the injection site, and transgene expression persists for 21 days. Acute toxicity studies demonstrated that simian adenovirus type 25 vector was well-tolerated, with no animal deaths or detectable toxic effects.

Conclusion. The new platform based on the recombinant simian adenovirus type 25 is not inferior to the existing and well-established delivery systems based on human adenovirus types 5 and 26. Due to its high level of gene transfer and favorable safety profile, the use of the simian adenovirus type 25 in medicine has the potential to offer many benefits for the development of vaccines against future infectious diseases.

Keywords: adenovirus vector, human adenovirus, simian adenovirus, tropism, biodistribution, acute toxicity

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 Committee on Biomedical Ethics of the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia (protocol No. 30, October 28, 2022).

Funding source. The study was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation “Development of a technological platform for the creation of recombinant, including live vaccines for the prevention of infectious diseases”.

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

For citation: Vavilova I.V., Ozharovskaia T.A., Zubkova O.V., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Zrelkin D.I., Dzharullaeva A.Sh., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. *In vitro* and *in vivo* tropism and biodistribution of recombinant simian adenovirus type 25. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):594–605.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-573>

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

Введение

Аденовирусы (Ad) — это безоболочечные ДНК-содержащие вирусы икосаэдрической формы. Семейство *Adenoviridae* состоит из 6 родов, среди которых вирусы рода *Mastadenovirus*, инфицирующие млекопитающих, в том числе человека [1]. Ad человека разделяют на 7 видов (*Mastadenovirus adami*, *Mastadenovirus blackbeardi*, *Mastadenovirus*

caesari, *Mastadenovirus dominans*, *Mastadenovirus exoticum*, *Mastadenovirus faecale*, *Mastadenovirus russelli*) в зависимости от их морфологических, вирусологических, серологических и генетических характеристик. Давно и широко изучены фундаментальные биологические свойства Ad вида *Mastadenovirus caesari* (ранее аденовирусы человека подгруппы C), что сделало их популярными объ-

ектами для разработки векторных систем доставки чужеродной генетической информации *in vivo* и *in vitro* [2, 3].

К настоящему времени достигнуты значительные успехи в использовании Ad в качестве векторных вакцин [3–6]. В течение последних 10 лет в России были одобрены и зарегистрированы вакцины для профилактики болезни, вызванной вирусом Эбола, и коронавирусной инфекции COVID-19 [7, 8]. Опыт вакцинации во время пандемии COVID-19 доказал безопасность и эффективность векторных вакцин на основе Ad. Для проведения масштабной вакцинации использовали 3 Ad-платформы: на основе Ad человека 5-го (Ad5), 26-го серотипов (Ad26) и Ad шимпанзе (изолят Y25) [5, 7, 9]. Несмотря на большое количество клинических исследований, только несколько серотипов Ad человека и шимпанзе (Ad6, Ad35, ChAd63, ChAd3) были изучены в качестве основы для векторных вакцин [10]. Разные серотипы обладают различными характеристиками в клеточном тропизме, что может играть ключевую роль в индукции иммунного ответа, влияя на экспрессию и распределение целевого антигена [11]. Ключевыми характеристиками при выборе альтернативных серотипов являются низкая серопревалентность в человеческой популяции и способность вызывать высокий уровень специфических иммунных реакций на целевой антиген.

Ранее нами была разработана технологическая платформа на основе Ad обезьян 25-го серотипа (SAd25) [12]. **Целью** данного исследования было сравнение тропизма Ad5 и Ad26 и SAd25 *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Клеточные линии

В экспериментах использовали 15 клеточных линий разного происхождения:

1) клетки человека: HEK 293 (клетки почки эмбриона, трансформированные E1-областью Ad5), H292 (клетки мукоэпидермоидной карциномы лёгкого), H460 (клетки крупноклеточной карциномы лёгкого), H1299 (клетки немелкоклеточного рака лёгкого), A549 (клетки аденокарциномы лёгкого), A431 (клетки эпидермоидной карциномы), GL-6 (клетки глиобластомы), ЛЭЧ-Т (клетки лёгкого эмбриона), HeLa (клетки карциномы шейки матки);

2) клетки обезьян: две линии клеток почки зелёной мартышки (CV-1 и Vero E6);

3) клетки мышей: L929 (клетки фибробластов) и ЭПНТ-5 (клетки глиобластомы);

4) клетки хомячков: СНО (клетки яичника китайского хомячка) и ВНК-21 (клетки почки новорождённого сирийского хомячка).

Рекомбинантные аденовирусы

Рекомбинантные Ad5- и Ad26-векторы, несущие репортерный ген усиленного зелёного флуоресцентного белка EGFP (rAd5-EGFP и rAd26-EGFP), ген люциферазы (rAd5-Luc, rAd26-Luc), получены ранее [7, 12, 13]. Для клонирования гена люциферазы или гена гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 в геном rSAd25 использовали методику, описанную ранее [12]. pArms-SAd25-Luc или pArms-SAd25-S-CoV2, несущие экспрессионные кассеты с репортерным геном или антигеном, линейаризовали и соединяли с pSAd25-EGFP, содержащей $\Delta E1/\Delta E3$ геном. После электропорации в клетках *Escherichia coli* BJ5183 в результате гомологичной рекомбинации получили pSAd25-Luc или pSAd25-S-CoV2, кодирующие $\Delta E1/\Delta E3$ геном SAd25 с экспрессионной кассетой. rAd оживляли и наращивали в клетках HEK 293.

Лабораторные животные

Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта РФ (ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»), а используемые методики одобрены комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 30 от 28.10.2022). Шестинедельные самки мышей BALB/c (18–20 г) получены из Пущинского питомника (Россия; аккредитован Международной ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными). Аутбредные (беспородные) мыши и крысы получены из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Животные имели свободный доступ к воде и стандартному корму для грызунов.

Определение инфекционного титра аденовирусов

Количество инфекционных Ad-частиц определяли методом титрования по конечной точке наличия цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток HEK 293. Клетки рассевали на 96-луночные планшеты в количестве 3×10^4 клеток на лунку. Затем вносили последовательные 10-кратные разведения вируса в 8 повторах. Планшеты инкубировали 12–14 сут, результат учитывали визуально по наличию ЦПД. Расчёт титра вируса проводили по формуле Риды–Менча и выражали в ТЦД₅₀/мл [14].

Определение репликации аденовирусов

Для исследования кинетики репликации Ad культуру клеток HEK 293 рассевали на 96-луночные планшеты в количестве 3×10^4 клеток на лунку. Далее клетки инфицировали препаратами rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rSAd25-EGFP в дозе 0,01 ТЦД₅₀/клетку. Культуральные планшеты инкубировали 6–7 дней при 37°C и 5% CO₂. Учёт результатов

проводили с помощью автоматического микроскопа «Lionheart FX Automated Microscope» («BioTek Instruments Inc.»).

Трансдукция клеточных линий рекомбинантными аденовирусами

За 2–3 ч до трансдукции клетки рассеивали на 48-луночные планшеты в количестве 10^5 клеток/луноку. Далее клетки трансдуцировали препаратами rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rSAd25-EGFP в дозе 1 ТЦД₅₀/клетку. Культуральные планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Интенсивность флуоресценции измеряли на гибридном мультифункциональном ридере «Synergy H1» («BioTek Instruments Inc.») с помощью программного обеспечения «Gen5 Microplate Reader» и «Imager Software».

Введение рекомбинантных аденовирусов животным

Для исследования биораспределения rAd вводили однократно внутримышечно в дозе 10^{10} или 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на животное ($n = 3$). Контрольной группе животных вводили стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) («Панэко»). Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 30 от 28.10.2022).

Определение ДНК аденовирусов в органах и тканях животных

Через 24 ч после введения rAd проводили эвтаназию животных. Отбирали органы, взвешивали и гомогенизировали в ФСБ. ДНК выделяли при помощи набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» («Promega»). Вирусную ДНК определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе «CFX 96» («Bio-Rad»): праймеры (5'-GGCGGCTGGCGGTAGA-3' и 5'-GCAACATCTGGAACCGCG-3'), смесь qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). За начальной стадией денатурации (5 мин при 95°C) следовали 40 циклов по 15 с при 95°C, 30 с при 61°C и 30 с при 72°C. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Bio-Rad CFX Manager».

Биолюминесцентная визуализация in vivo

Люциферин («Promega»; 2,5 мг/животное) вводили в ФСБ и вводили мышам внутрибрюшинно на 1, 3, 7, 14 и 21-й дни после введения rAd. Животных анестезировали изофлураном («Piramal Critical Care») в течение 5–10 мин, после чего проводили визуализацию биолюминесценции на приборе «IVIS Lumina Series II» («Caliper»). Время экспозиции было скорректировано, чтобы избежать пере-сыщения пикселей, а измерения потока были преобразованы в фотоны в секунду для сравнительной оценки люминесценции в разные моменты времени.

Данные люминесцентного изображения анализировали с использованием программного обеспечения «Living Image v. 4.2».

Методы оценки острой токсичности

В эксперименте по изучению токсичности оценивали влияние rSAd25-S-CoV2 на состояние экспериментальных животных (мышей и крыс) при внутримышечном (для мышей и крыс) и внутривенном (для мышей) введении. Для каждого способа введения были сформированы 4 группы аутобредных мышей обоего пола (по 10 самок и 10 самцов в группе), которым вводили rAd в разных дозах (10^9 , 10^{10} и 10^{11} в.ч./животное). Контрольной группе вводили ФСБ. Формировали 3 группы крыс (по 10 самок и 10 самцов в группе), которым вводили rAd в разных дозах (10^{10} и 10^{11} в.ч./животное). Контрольной группе вводили ФСБ. После однократного введения препарата за животными наблюдали в течение 14 дней, ежедневно проводя клинический осмотр. Фиксировали параметры функционального состояния, внешний вид, физиологические функции. На 0, 7 и 14-й дни производили взвешивание. На 14-й день животных подвергали эвтаназии и проводили полную некропсию. При некропии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями, а также скелетно-мышечную систему.

Статистический анализ

Обработку данных проводили с использованием компьютерных программ «GraphPad 8.0» («GraphPad Software») и «Excel» («Microsoft»). Для количественных результатов рассчитывали среднее арифметическое, среднее геометрическое, стандартную ошибку среднего, стандартное отклонение. При анализе данных несвязанных выборок использовали критерий Стьюдента, критерий Манна–Уитни или критерий Краскела–Уоллиса. Априорный уровень значимости принимали равным $\alpha = 0,05$. Различия считали статистически достоверными при достигнутом уровне значимости $p < \alpha$.

Результаты

Конструирование рекомбинантных векторов на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа

Рекомбинантный репликативно-дефектный вектор на основе SAd25 с репортерным геном EGFP (rSAd25-EGFP) получен ранее [12]. Аналогичным образом были получены рекомбинантные векторы, несущие ген люциферазы (rSAd25-Luc) и ген S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (rSAd25-S-CoV2) (рис. 1, а).

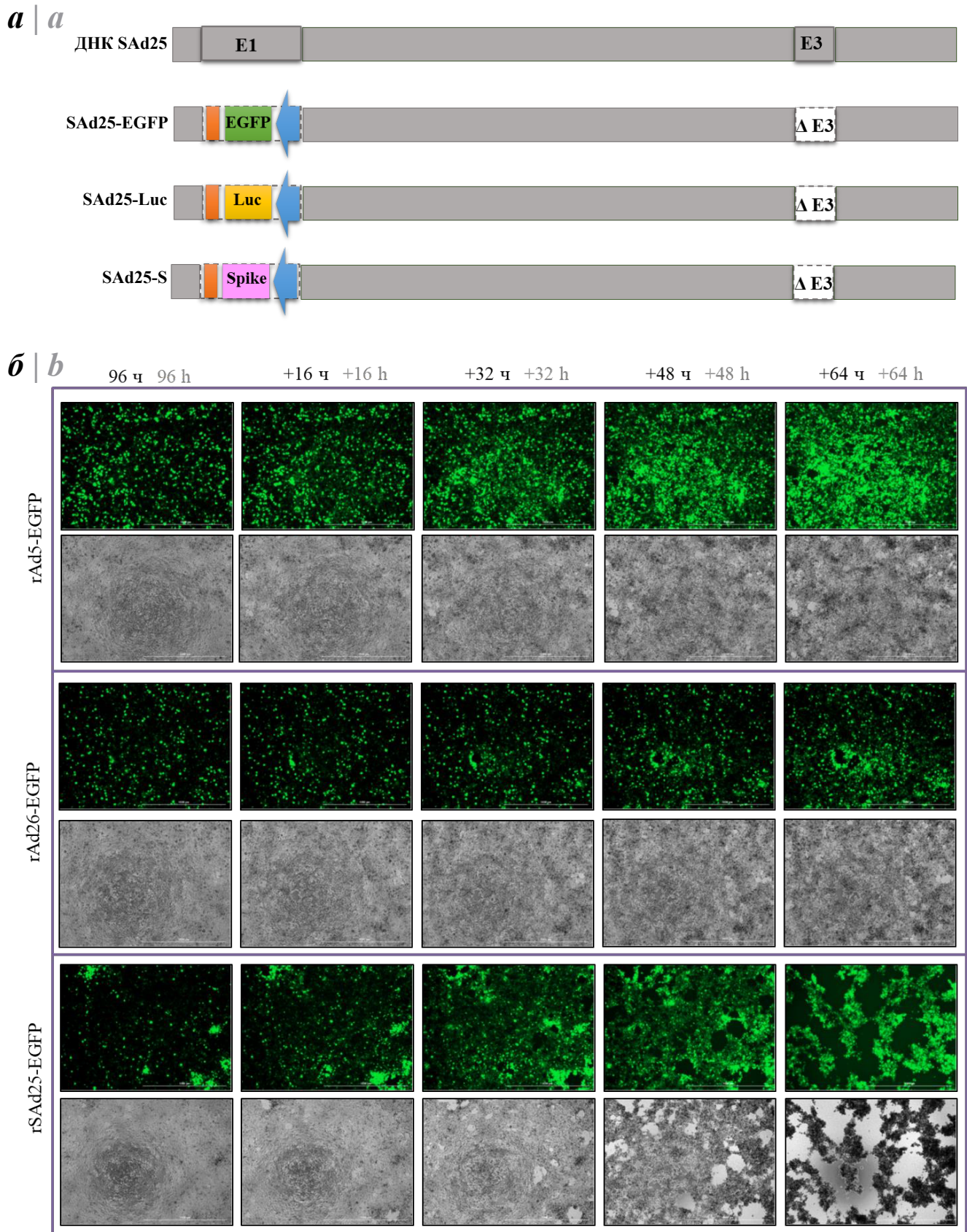


Рис. 1. Схематическое изображение геномов рекомбинантных SAd25 (а) и сравнение эффективности репродукции rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP и rAd26-EGFP в HEK 293 (б).

Fig. 1. Schematic representation of the recombinant SAd25 genomes (a) and comparison of the reproduction efficiency of rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP and rAd26-EGFP in HEK 293 (b).

Для оценки эффективности репродукции рекомбинантного вектора на основе Ad обезьян в пермиссивной культуре использовали rSAd25-EGFP, несущий ген репортерного флуоресцентного белка. В качестве векторов сравнения служили rAd5-EGFP и rAd26-EGFP с аналогичным трансгеном. Клетки HEK 293 инфицировали исследуемыми Ad из расчёта приблизительно 1 инфекционная частица на 100 клеток. Визуальную оценку результатов проводили начиная с 96 ч после трансдукции каждые 16 ч (рис. 1, б).

Через 96 ч наблюдали интенсивную флуоресценцию, индуцируемую рекомбинантными вирусными векторами. При этом, в отличие от векторов сравнения, только в лунках с rSAd25-EGFP детектировали формирование флуоресцентных фокусов, что свидетельствует о более высокой скорости накопления вирусного потомства в заражённых клетках. С течением времени фокусы увеличивались в размере, что приводило к лизису клеточного монослоя и ярко выраженному цитопатическому действию. Таким образом, вектор rSAd25 обладает литическим потенциалом, репликация приводит к значительно большему повреждению клеток в сравнении с rAd5 и rAd26.

Исследование тропизма rSAd25-EGFP in vitro

Для определения тропизма rSAd25 была исследована эффективность трансдукции различных типов клеток (человека, хомячка, обезьяны, мыши) по сравнению с широко используемыми векторами rAd5 и rAd26. Используемые репликативно-дефек-

тные векторы содержали ген *EGFP* под контролем промотора цитомегаловируса, что обеспечивает аналогичные уровни экспрессии после трансдукции. Все клеточные линии были трансформированы rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP и rAd26-EGFP в дозе 1 ТЦД₅₀/клетку. Указанная доза вируса, с одной стороны, не обладает цитотоксичностью, а с другой — позволяет рассчитывать на то, что каждая клетка будет содержать примерно только 1 в.ч. Трансдукция более высокой дозой приводит к заражению одной клетки несколькими вирусными частицами, и, следовательно, экспрессия трансгена не линейна. Эффективность трансдукции оценивали по уровню флуоресценции EGFP в клетках и выражали в относительных единицах. Итоговое значение определяли путём вычитания уровня флуоресценции интактных клеток из уровня флуоресценции трансдуцированных (рис. 2).

Экспрессия EGFP была обнаружена во всех используемых типах клеток. Трансдукция клеток обезьян Vero E6 отличалась при использовании различных Ad-векторов. Наибольший уровень экспрессии EGFP в клетках Vero E6 наблюдали для rSAd25-EGFP.

В клетки хомячка (ВНК-21, СНО) и мыши (L929, ЭПНТ-6) исследованные Ad проникали с сопоставимой эффективностью.

Тропизм rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP и rAd26-EGFP отличался в клетках человека. SAd25-EGFP с большей эффективностью проникал в клетки глиобластомы человека GL-6. Уровень флуоресценции

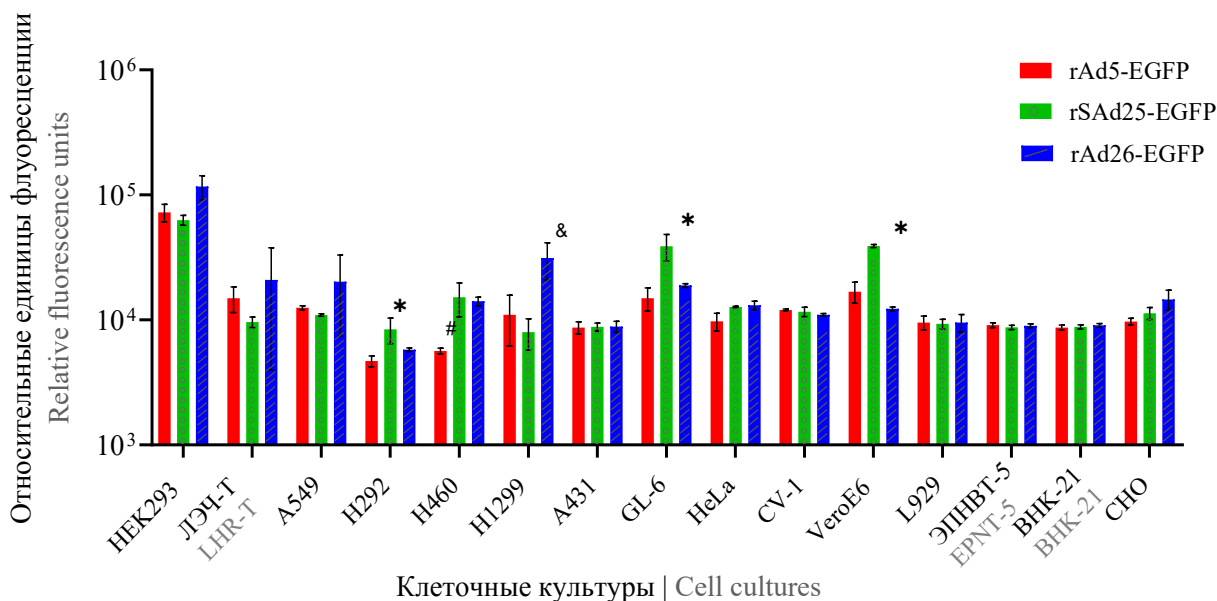


Рис. 2. Тропизм rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rSAd25-EGFP к различным культурам клеток млекопитающих.

* — статистически достоверная разница с rSAd25-EGFP; & — статистически достоверная разница с rAd26-EGFP; # — статистически достоверная разница с rAd5-EGFP.

Fig. 2. Tropism of rAd5-EGFP, rAd26-EGFP and rSAd25-EGFP to different mammalian cell cultures.

* — statistically significant difference with rSAd25-EGFP; & — statistically significant difference with rAd26-EGFP; # — statistically significant difference with rAd5-EGFP.

rSAd25-EGFP в клетках карциномы лёгкого человека H292 и H460 был достоверно выше, чем для rAd5-EGFP. При этом в другой линии клеток карциномы лёгкого (H1299) преимущество показал rAd26-EGFP.

Оценка биораспределения рекомбинантных аденовирусов *in vivo*

Особенности биораспределения rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rSAd25-EGFP изучали в экспериментах на мышах линии BALB/c двумя методами: по определению вирусных геномов и по экспрессии трансгена. Через 24 ч после внутримышечного введения rAd в дозе 10^{10} в.ч. анализировали количество копий генома Ad в тканях и органах с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (рис. 3).

Среди 14 отобранных органов и тканей вирусную ДНК в основном обнаруживали в образцах мышц, взятых из места введения. При этом количество копий ДНК rSAd25-EGFP в мышцах было значительно больше, чем ДНК rAd26-EGFP и rAd5-EGFP соответственно. Помимо места инъекции, небольшое количество геномов rAd5 было обнаружено в нижних лимфатических узлах, а также в крови (rSAd25 и rAd5).

Для биолюминесцентной визуализации использовали rAd, экспрессирующие ген люциферазы, которые вводили животным внутримышечно в дозе 10^{11} в.ч. Для всех типов Ad биолюминесцентный сигнал был обнаружен только в месте инъекции (рис. 4). После однократного введения rAd5-Luc, rAd26-Luc или rSAd25-Luc самую высокую экспрессию люциферазы детектировали через 1 сут

после введения (рис. 4, а). Наибольшая активность люциферазы наблюдалась у мышей, которым вводили rAd5-Luc, в то время как наименьшая активность — у группы мышей с rAd26-Luc. Активность люциферазы постепенно снижалась к 21-му дню для всех аденовирусов (рис. 4, б). При этом наименьшее падение уровня экспрессии трансгена (примерно в 100 раз) наблюдали у мышей, которым вводили rSAd25-Luc. Для rAd5-Luc и rAd26-Luc активность люциферазы снизилась более чем в 250 и 400 раз соответственно (рис. 4, в).

Изучение острой токсичности rSAd25

Исследование острой токсичности rSAd25, экспрессирующего целевой ген белка S вируса SARS-CoV-2 (rSAd25-S-CoV2), проводили на мышах и крысах обоих полов при однократном внутримышечном или внутривенном введении. Использование rAd с целевым антигеном позволяет наиболее адекватно оценить токсичность как самого вектора, так и вставки.

Тестируемые животные (мыши и крысы) хорошо перенесли как внутримышечное, так и внутривенное введение Ad-препарата во всех дозах. За время наблюдения ни одно животное не пало, клинических признаков интоксикации не наблюдали. Интегральные показатели состояния животных не различались между опытными и контрольными группами. Отмечена положительная динамика изменения массы тела животных во всех группах (рис. 5).

При макроскопическом исследовании мышей не установлено влияния rSAd25 на состояние вну-

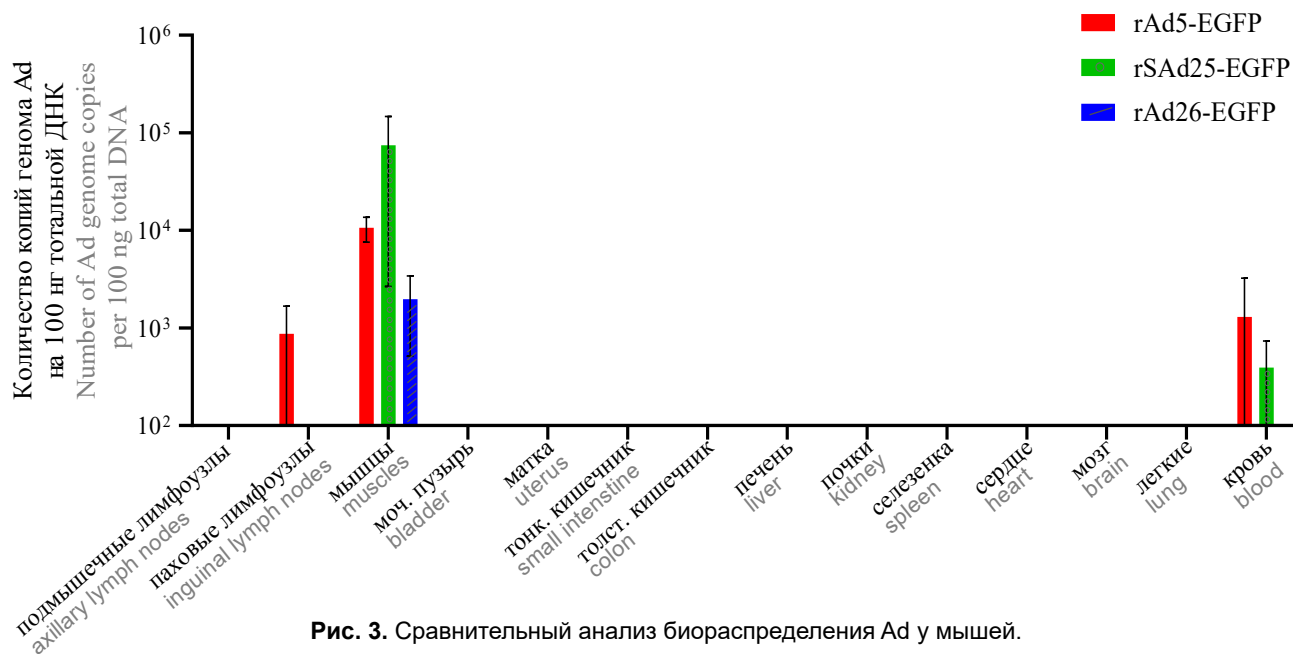
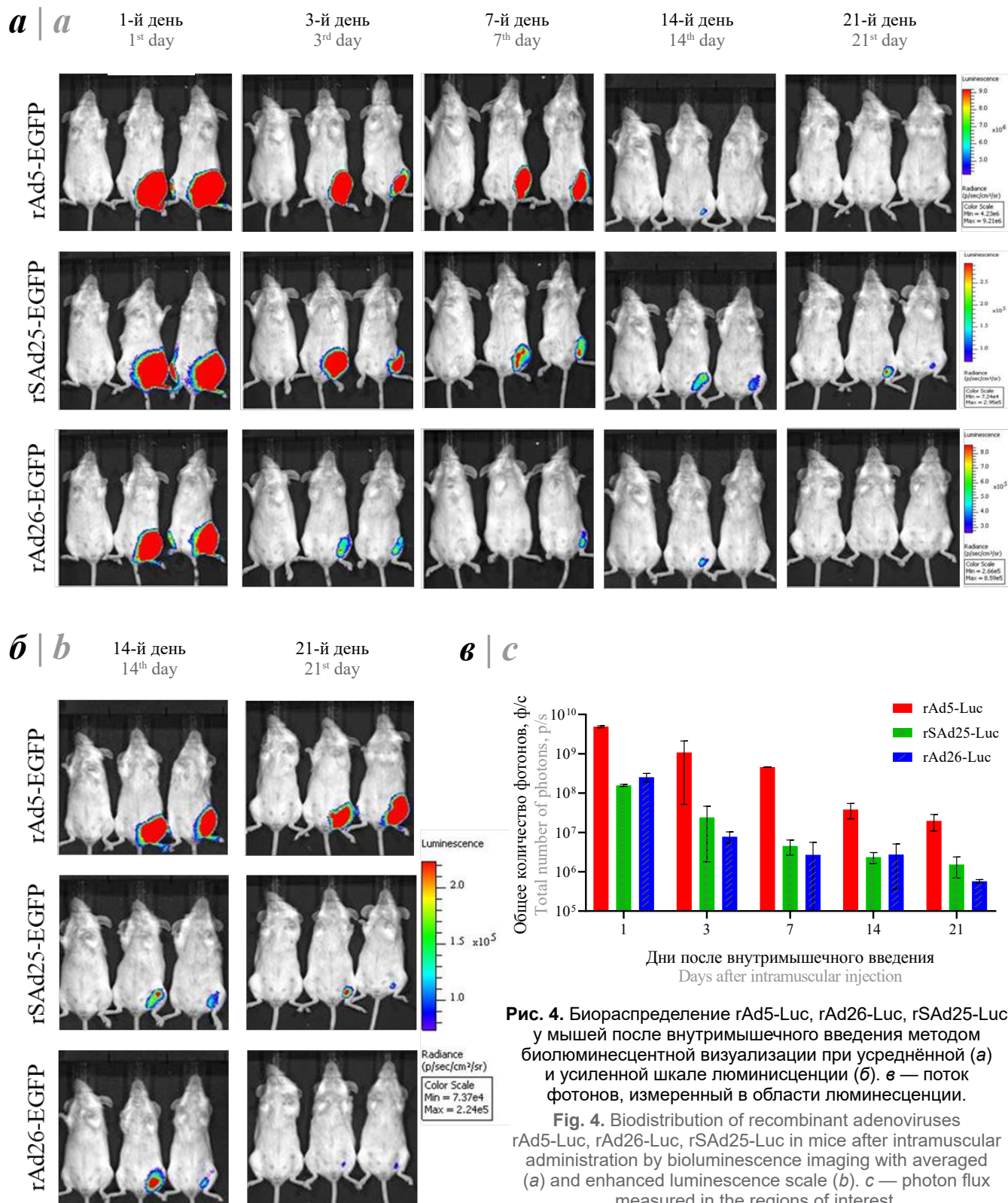


Рис. 3. Сравнительный анализ биораспределения Ad у мышей.

Каждый столбец представляет собой среднее количество геномов со стандартным отклонением.

Fig. 3. Comparative analysis of adenovirus biodistribution in mice.

Each column represents the average number of genomes with a standard deviation.



тренных органов; различий между контрольными и опытными группами не обнаружено. Макроскопическое исследование самцов крыс выявило различия между экспериментальной и контрольной группами. У 4 из 10 самцов крыс, которым вводили 10^{11} в.ч., и у 2 из 10 самцов крыс, которым вводили

10^{10} в.ч., наблюдали участки снижения воздушности тканей лёгкого (ателектазы) и очаги коагуляционного некроза с признаками организации. Важно отметить, что у исследуемых самок патоморфологических изменений лёгких не детектировали. Результаты макроскопического исследования других вну-

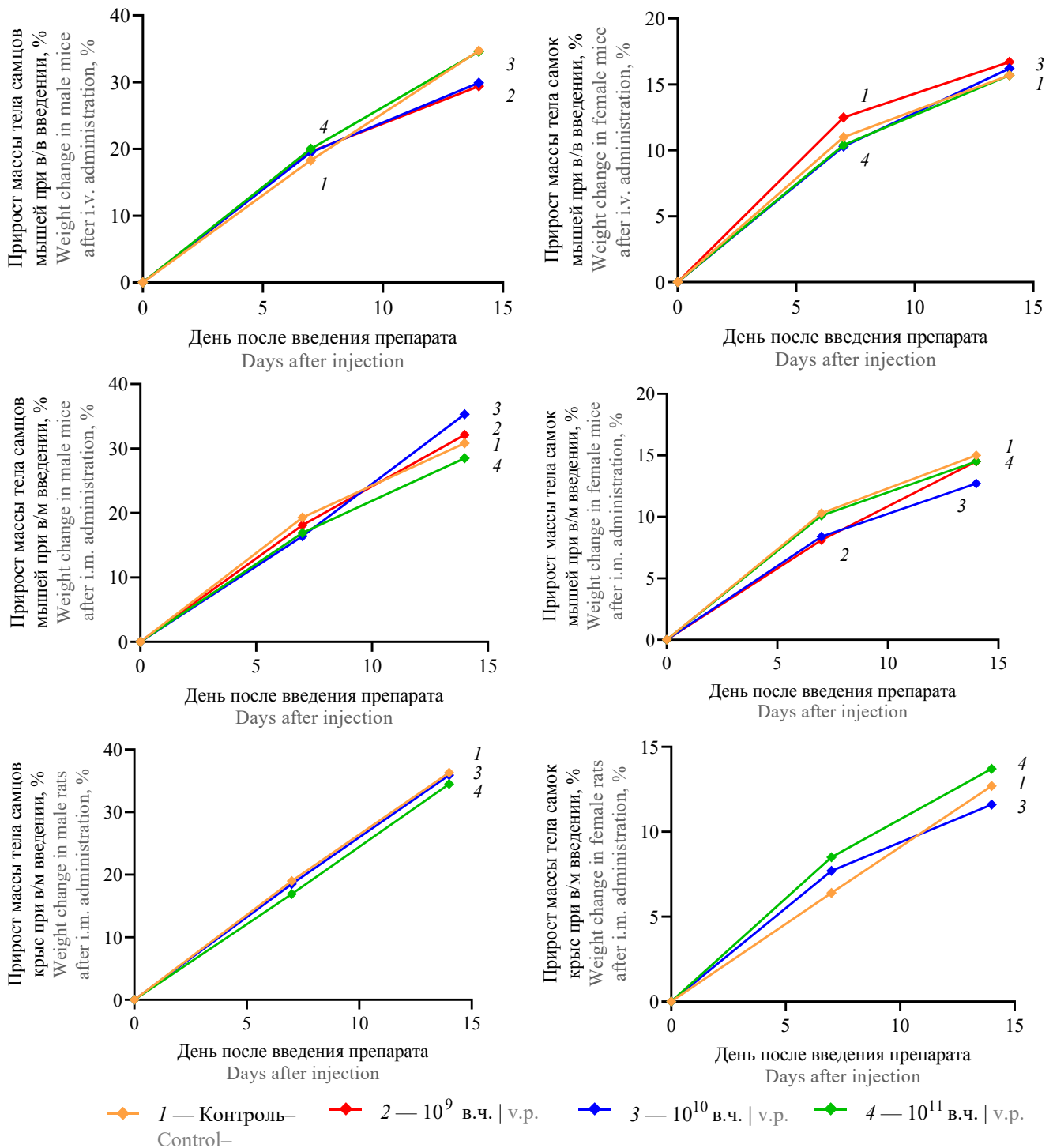


Рис. 5. Изучение острой токсичности rSAd25-S-CoV2 на мышях и крысах.

в/в — внутривенно; в/м — внутримышечно.

Fig. 5. Study of acute toxicity of rSAd25-S-CoV2 in mice and rats.

i.v. — intravenous; i.m. — intramuscular.

тренних органов крыс экспериментальных групп не отличались от таковых контрольной группы.

Обсуждение

Векторы на основе Ad являются отличными инструментами для доставки чужеродной генетиче-

ской информации в клетки млекопитающих за счёт большой пакующей ёмкости и высоких функциональных титров. Ад-векторы широко применяются для разработки векторных вакцин и генотерапевтических препаратов. Однако их использование может быть ограничено в случаях, когда целевые клетки не

имеют рецепторов, участвующих в прикреплении и интернализации. При этом использование векторов на основе Ad альтернативных серотипов будет иметь значение только при высоком репродуктивном потенциале выбранного вектора.

Стандартной стратегией для получения рекомбинантных репликативно-дефектных Ad является удаление E1-области генома. Одним из важных аспектов успешной комплементации E1-делетированных Ad является функциональное взаимодействие белка E1B 55K (производимого транс-комплементарной клеточной линией) с белком E4 34K в геноме вируса. При этом разработка комплементарных линий клеток для разных серотипов репликативно-дефектных векторов является трудоёмким процессом. Поэтому наличие серотипов, не относящихся к Ad человека, способных реплицироваться в таких клетках, как HEK 293 (клетки человека, трансформированные E1-областью Ad5), является большим преимуществом. Несмотря на то что сходство последовательности между белками E1B 55K Ad5 и SAd25 составляет около 56%, rSAd25-EGFP был получен и накоплен в высоких титрах в культуре клеток HEK 293 без дополнительных модификаций вирусного генома. Полученные результаты значительно отличаются от данных других исследований, в которых показано, что для успешной репликации рекомбинантного вектора необходима замена открытой рамки считывания 6 в E4-области [15].

Характер экспрессии Ad-рецепторов на поверхности клеток (как первичных, так и вторичных) определяет тропизм вируса, который обуславливает спектр применения векторов. SAd25 в качестве первичного клеточного рецептора, как и большинство других серотипов Ad, использует CAR (coxsackie and adenovirus receptor) [16, 17]. Аминокислоты, участвующие во взаимодействии с CAR, находятся в петле AB knob-домена фибера. Ключевыми аминокислотами у Ad5 являются Ser408, Pro409, Lys417 и соответствующие аминокислоты у других серотипов: у Ad26 — Ser196, Pro197, Lys205, у SAd25 — Ser255, Pro256, Lys267 [17]. Последовательности фиберов Ad5 и SAd25 похожи на 63,9%, и неудивительно, что оба распознают один и тот же рецептор. В качестве вторичного рецептора для интернализации SAd25, как и Ad5 и Ad26, использует α -интегрины за счёт наличия последовательности RGD (Arg-Glu-Asp) в основании пентона [18].

Чтобы лучше понять тропизм SAd25, мы проанализировали эффективность трансдукции SAd25 в сравнении с Ad5 и Ad26, используя репликативно-дефектные векторы, экспрессирующие EGFP (SAd25-EGFP, Ad5-EGFP, Ad26-EGFP). Результаты экспериментов показали, что SAd25 эффективно проникает во все исследуемые клеточные линии. Широкий профиль трансдукции объясняется его

взаимодействием с CAR и α v-интегринами. Однако взаимодействие с этими рецепторами не является единственным фактором, определяющим клеточный тропизм вируса. На наблюдаемые различия в тропизме Ad подгрупп C, D и E может существенно влиять длина фибера, т. к. она является основным фактором, который определяет стратегию прикрепления Ad к клетке. Поэтому интересным аспектом нашего анализа была повышенная тропность SAd25 к клеткам нейробластомы человека. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы конкретно определить механизм проникновения вируса в эти клетки.

В проведённом исследовании показано биораспределение SAd25 по детекции вирусной ДНК в органах или тканях и экспрессии трансгена. Следует отметить, что эти два показателя не обязательно совпадают друг с другом по нескольким причинам: один и тот же промотор может иметь переменную активность в разных типах клеток; различные типы вирусов могут иметь разные судьбы после попадания в один и тот же тип клеток; деградировавший вирус в лизосоме больше не может экспрессировать трансген, но вирусная ДНК ещё обнаруживается.

Учитывая, что внутримышечный путь является наиболее часто используемой стратегией вакцинации, проведено сравнение векторов на основе разных типов Ad после однократного введения. Локальная экспрессия гена люциферазы продолжалась 3 нед и постепенно снижалась. Уровень экспрессии после введения rSAd25-Luc был ниже, чем после rAd5-Luc, но выше, чем после введения rAd26-Luc. Таким образом, полученные данные показали, что SAd25 может быть отличным вектором для разработки вакцин, наряду с Ad5 и Ad26.

Результаты определения острой токсичности продемонстрировали, что однократное внутримышечное или внутривенное введение SAd25 мышам в дозах, превышающих эквитерапевтическую дозу в 100 и 1000 раз, хорошо переносится животными. Гибель и клинические проявления токсических реакций не наблюдали. Однократное внутримышечное введение SAd25 крысам в диапазоне исследуемых доз не приводило к значимому токсическому действию. У некоторых самцов крыс были обнаружены патоморфологические изменения в лёгких, которые не сопровождалась клиническими проявлениями. Других токсических реакций не обнаружено. Не ясно, связаны ли эти изменения с введением Ad-вектора или вызваны другими факторами, а также являлись ли изменения временными или носили постоянный характер. Указанные факторы требуют дальнейшего изучения, в том числе проведения полного цикла доклинических исследований. В целом полученные данные согласуются с результатами, полученными для других векторов на основе различных Ad [19–21].

Заключение

Новая платформа на основе SAd25 не уступает уже существующим и хорошо зарекомендовавшим себя платформам на основе Ad5 и Ad26. Учитывая актуальные вызовы, такие как появление новых вирусных инфекций, например пандемия COVID-19, и возвращение в популяцию известных патогенов, использование Ad обезьян может существенно ускорить процесс разработки и внедрения новых вакцин. В конечном итоге это будет способствовать улучшению здоровья населения как в России, так и за её пределами.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Benko M., Aoki K., Arnberg N., et al. ICTV virus taxonomy profile: adenoviridae 2022. *J. Gen. Virol.* 2022;103:001721. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721>
- Crystal R.G. Adenovirus: The first effective *in vivo* gene delivery vector. *Hum. Gene Ther.* 2014;25:3–11. DOI: <https://doi.org/10.1089/hum.2013.2527>
- Fougeroux C., Holst P.J. Future prospects for the development of cost-effective adenovirus vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:686. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18040686>
- Majhen D. Human adenovirus type 26 basic biology and its usage as vaccine vector. *Rev. Med. Virol.* 2022;32:e2338. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.2338>
- Patel R., Kaki M., Potluri V.S., et al. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022;18:2002083. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>
- Ledgerwood J.E., Sullivan N.J., Graham B.S. Chimpanzee adenovirus vector Ebola vaccine – preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 2015;373:776. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1505499>
- Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020;396(10255):887–97. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
- Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017;13(3):613–20. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1238535>
- Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2020;396(10249):479–88. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)
- Trivedi P.D., Byrne B.J., Corti M. Evolving horizons: adenovirus vectors' timeless influence on cancer, gene therapy and vaccines. *Viruses.* 2023;15(12):2378. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15122378>
- Marquez-Martinez S., Vijayan A., Khan S., Zahn R. Cell entry and innate sensing shape adaptive immune responses to adenovirus-based vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2023;80:102282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102282>
- Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В. и др. Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. *Вестник ПГМУ.* 2023;(1):4–11. Ozharovskaja T.A., Popova O., Zubkova O.V., et al. Development and characterization of a vector system based on the simian adenovirus type 25. *Bulletin of RSMU.* 2023;(1):4–11. DOI: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2023.006>
- Logunov D.Y., Zubkova O.V., Karyagina-Zhulina A.S., et al. Identification of HI-like loop in CELO adenovirus fiber for incorporation of receptor binding motifs. *J. Virol.* 2007;81(18):9641–52. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00534-07>
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016;5(2):85–6. DOI: <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Lan W., Quan L., Li Y., et al. Isolation of novel simian adenoviruses from macaques for development of a vector for human gene therapy and vaccines. *J. Virol.* 2023;97(10):e0101423. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01014-23>
- Roelvink P.W., Lizonova A., Lee J.G., et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 1998;72(10):7909–15. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.10.7909-7915.1998>
- Law L.K., Davidson B.L. What does it take to bind CAR? *Mol. Ther.* 2005;12(4):599–609. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ythm.2005.05.017>
- Zhang Y., Bergelson J.M. Adenovirus receptors. *Journal of Virology.* 2005;79(19):12125–31. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12125-12131.2005>
- Tandon M., Sharma A., Vemula S.V., et al. Sequential administration of bovine and human adenovirus vectors to overcome vector immunity in an immunocompetent mouse model of breast cancer. *Virus Res.* 2012;163(1):202–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.031>
- Lichtenstein D.L., Spencer J.F., Dronin K., et al. An acute toxicology study with INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, in mice and permissive Syrian hamsters; comparisons with wild-type Ad5 and a replication-defective adenovirus vector. *Cancer Gene Ther.* 2009;16(8):644–54. DOI: <https://doi.org/10.1038/cgt.2009.5>
- Hassan P.M., Ali T., Saber E., et al. Potency, toxicity and protection evaluation of PastoCoAd candidate vaccines: Novel pre-clinical mix and match rAd5 S, rAd5 RBD-N and SOBERANA dimeric-RBD protein. *Vaccine.* 2022;40(20):2856–68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.03.066>

Информация об авторах

Вавилова Ирина Викторовна[✉] — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, vavilovairinav@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0008-6272-0368>

Ожаровская Татьяна Андреевна — к. б. н., с. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>

Зубкова Ольга Вадимовна — к. б. н., в. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>

Попова Ольга — м.н.с., лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>

Воронина Дарья Владимировна — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6629-744X>

Голдовская Полина Павловна — лаборант-исследователь лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0000-1965-0482>

Зрелкин Денис Игоревич — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8357>

Джаруллаева Алина Шахмировна — к. б. н., н. с. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1743-0798>

Должикова Инна Вадимовна — к. б. н., зав. лаб. государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

Щебляков Дмитрий Викторович — к. б. н., в. н. с., зав. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Логунов Денис Юрьевич — д. б. н., академик РАН, зав. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Александр Леонидович Гинцбург — д. б. н., академик РАН, профессор, директор НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Участие авторов: Вавилова И.В. — проведение экспериментов, статистическая обработка данных, визуализация, написание и редактирование статьи; Ожаровская Т.А., Попова О. — проведение исследований, получение генно-инженерных конструкций; Зубкова О.В. — участие в формулировании концепции и плана экспериментов, редактирование текста статьи; Воронина Д.В. — проведение иммунологических исследований; Зрелкин Д.И. — проведение ПЦР-анализов и обработка данных; Голдовская П.П., Джаруллаева А.Ш. — комплекс работ по экспериментам с животными; Должикова И.В. — редактирование текста рукописи; Щебляков Д.В. — редактирование текста рукописи, концептуализация, руководство; Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. — руководство проектом госзадания, привлечение финансирования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.08.2024;
принята к публикации 10.10.2024;
опубликована 30.10.2024

Information about the authors

Irina V. Vavilova[✉] — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, vavilovairinav@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0008-6272-0368>

Tatiana A. Ozharovskaia — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>

Olga V. Zubkova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>

Olga Popova — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>

Daria V. Voronina — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6629-744X>

Polina P. Goldovskaya — laboratory assistant researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0000-1965-0482>

Denis I. Zrelkin — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8357>

Alina Sh. Dzharrullaeva — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of cellular microbiology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1743-0798>

Inna V. Dolzhikova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of the State Virus Collection, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

Dmitry V. Shcheblyakov — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Denis Yu. Logunov — D. Sci. (Biol.), RAS Full Member, Head, Laboratory of cellular microbiology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Alexander L. Gintsburg — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Director, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Author contribution: Vavilova I.V. — experimental work, statistical data processing, visualization, writing and editing the article; Ozharovskaia T.A., Popova O. — research work, obtaining genetically engineered constructs; Zubkova O.V. — participation in the formulation of the concept and plan of experiments, editing the text of the article; Voronina D.V. — immunological studies; Zrelkin D.I. — PCR analysis and data processing; Goldovskaya P.P., Dzharrullaeva A.S. — a set of works on experiments on animals; Dolzhikova I.V. — editing the text of the article; Shcheblyakov D.V. — editing the manuscript, conceptualization, supervision; Logunov D.Y., Gintsburg A.L. — project management of the state task, funding acquisition. 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 09.08.2024;
accepted for publication 10.10.2024;
published 30.10.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-557>



Современные данные о циркуляции возбудителя лихорадки Ку на территории Гвинейской Республики

Найденова Е.В.^{1,✉}, Захаров К.С.¹, Агафонов Д.А.¹, Карташов М.Ю.², Сеничкина А.М.¹, Халилов Э.С.³, Ibrahim A.B.⁴, Bah M.B.⁴, Nourdine I.^{4,5}, Токаревич Н.К.³, Boumbaly S.^{4,5}, Sidime Y.⁶, Щербакова С.А.¹, Кутырев В.В.¹

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Россия;

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

⁴Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика;

⁵Исследовательский центр вирусологии, Конакри, Гвинейская Республика;

⁶Институт медицинской ветеринарии, Далаба, Гвинейская Республика

Аннотация

Введение. Лихорадка Ку является наиболее изученным зоонозом, широко распространённым практически на всей территории Африки, исключая территорию Сахары. Однако сведения о заболеваемости коксиейлезом и циркуляции *Coxiella burnetii* на этом континенте являются ограниченными и неоднородными. В Гвинейской Республике в 1980–1990 гг. на базе Советско-Гвинейской научно-исследовательской вирусологической и микробиологической лаборатории проводились исследования по изучению распространения возбудителя лихорадки Ку, получены данные об иммунной прослойке населения и выявлены специфические антитела в сыворотках крови сельскохозяйственных животных. В последующие годы исследования были приостановлены.

Цель работы — получение современных данных о распространении *C. burnetii* на территории всех ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики.

Материалы и методы. Исследования проводили в лаборатории Российско-Гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (Киндия, Гвинейская Республика), для чего были получены 332 сыворотки крови лихорадящих больных и 3156 сывороток крови практически здоровых людей, 1074 образца крови сельскохозяйственных животных, 1648 суспензий клещей, 319 экземпляров мелких млекопитающих и 298 — рукокрылых. Исследование проводили методами иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции, отдельные образцы подвергали углублённому генетическому анализу.

Результаты и обсуждение. Проведено изучение распространения *C. burnetii* на территории всех ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики. Впервые выявлен и подтверждён лабораторными методами случай заболевания человека лихорадкой Ку. Установлена роль сельскохозяйственных животных, мелких млекопитающих и рукокрылых в циркуляции возбудителя. Показано, что основными переносчиками на территории Гвинеи являются иксодовые клещи видов *Amblyomma variegatum*, *Hyalomma truncatum* и *Rhipicephalus decoloratus*. При проведении молекулярно-генетических исследований выявлены штаммы *C. burnetii*, несущие плазмиду QpH1, способные вызывать заболевания людей и животных. Определены полные нуклеотидные последовательности 16S рРНК возбудителя лихорадки Ку, обнаруженного на территории Гвинеи, которые в последующем зарегистрированы в базе данных GenBank (OQ152497–OQ152500).

Заключение. С учётом полученных сведений о распространении возбудителя лихорадки Ку актуальной задачей остается продолжение изучения особенностей циркуляции *C. burnetii* на территории Гвинеи. Регулярный мониторинг и оценка факторов риска возникновения заболеваний, вызываемых коксиейлезами, позволят разработать алгоритм лабораторной диагностики и рекомендации для врачей.

Ключевые слова: лихорадка Ку, *Coxiella burnetii*, случаи заболевания, иммунная прослойка, носители и переносчики, Гвинейская Республика

Этическое утверждение. Исследование проводили при информированном согласии пациентов или их официальных представителей. Протокол исследования одобрен решением Национального этического комитета Министерства здравоохранения Гвинейской Республики (протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015). Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Исследование одобрено комиссией по биоэтике Российского противочумного института «Микроб» (протокол № 8 от 21.11.2023).

Благодарность. Авторский коллектив выражает благодарность за помощь в сборе материала руководству и сотрудникам лаборатории вирусных геморрагических лихорадок (Исследовательский центр вирусологии, Конакри, Гвинейская Республика), региональных госпиталей городов Конакри, Боке, Боффа, Коя, Маму, Киндия,

Лабе, Нзерекоре, Канкан, Дабола, Далаба, Фарана, а также сотрудникам Института прикладной биологии Гвинеи и Института медицинской ветеринарии (Гвинейская Республика).

Источник финансирования. Исследования проводились в рамках распоряжений Правительства РФ № 1448-р от 25.07.2015, № 2904-р от 22.12.2017 и № 2985-р от 14.11.2020 о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

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

Для цитирования: Найденова Е.В., Захаров К.С., Агафонов Д.А., Карташов М.Ю., Сеничкина А.М., Халилов Э.С., Ibrahim A.B., Bah M.B., Nouridine I., Токаревич Н.К., Boumbaly S., Sidime Y., Щербаклова С.А., Кутырев В.В. Современные данные о циркуляции возбудителя лихорадки Ку на территории Гвинейской Республики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):606–618.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-557>
EDN: <https://www.elibrary.ru/tezljr>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-557>

Current data on the circulation of the Q fever pathogen in the Republic of Guinea

Ekaterina V. Naidenova^{1✉}, Kirill S. Zakharov¹, Dmitrii A. Agafonov¹, Mikhail Yu. Kartashov², Aislu M. Senichkina¹, Erik S. Khalilov³, Abdoul B. Ibrahim⁴, Mamadou B. Bah⁴, Ibrahim Nouridine^{4,5}, Nikolai K. Tokarevich³, Sanaba Boumbaly^{4,5}, Ysuf Sidime⁶, Svetlana A. Shcherbakova¹, Vladimir V. Kuttyrev¹

¹Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia;

²State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Russia;

³Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia;

⁴Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

⁵Virology Research Center, Conakry, Republic of Guinea;

⁶Institute of Veterinary Medicine, Dalaba, Republic of Guinea

Abstract

Background. Q fever is the one of the best-studied zoonoses, which is widespread throughout almost the entire territory of Africa, excluding the territory of the Sahara. However, the current data on the incidence of coxiellosis and the circulation of *Coxiella burnetii* on this continent are limited and vary according different sources.

In 1980–1990, the Soviet-Guinean Research Virology and Microbiology Laboratory conducted studies to estimate the distribution of the Q fever pathogen, assess the herd immunity in humans and identify specific antibodies in the sera of livestock. However, in subsequent years, the research was suspended.

The aim of this study is to obtain up-to-date data on the distribution of *C. burnetii* in all landscape and geographical zones of the Republic of Guinea.

Materials and methods. The study was carried out in the laboratory of the Russian-Guinean Center for Epidemiology and Prevention of Infectious Diseases (Kindia, Republic of Guinea). The study involved 332 sera of febrile patients and 3156 sera from practically healthy volunteers, 1074 blood samples of livestock, 1648 suspensions of ticks, 319 specimens of small mammals and 298 of bats. The study was carried out using ELISA and PCR methods, selected samples were subjected to in-depth genetic analysis.

Results and discussion. The study of the distribution of *C. burnetii* on the territory of all landscape-geographical zones of the Republic of Guinea was carried out. For the first time, an officially registered case of human Q fever case has been identified. The role of livestock, small mammals and bats in the circulation of the pathogen has been established. It has been shown that the main vectors in Guinea are ixodid ticks of the *Amblyomma variegatum*, *Hyalomma truncatum* and *Rhipicephalus decoloratus* species. Employing molecular methods, *C. burnetii* strains carrying the QpH1 plasmid, capable of causing diseases in humans and animals were identified. For the first time, the complete nucleotide sequence of 16S rRNA of the Q fever pathogen (OQ152497–OQ152500) identified on the territory of Guinea was determined and registered in the GenBank database.

Conclusion. Taking into account the high epidemiological significance of Q fever, the study of the specifics of *C. burnetii* circulation in Guinea remains an urgent task. Regular monitoring and assessment of risk factors for diseases caused by coxiella are necessary for the development of an algorithm for laboratory diagnosis and recommendations for clinicians.

Keywords: Q fever, *Coxiella burnetii*, cases of the disease, immune stratum, carriers and vectors, Republic of Guinea

Ethics approval. The study was conducted with informed consent of patients or their official representatives. The study protocol was approved by the decision of the National Ethical Committee of the Ministry of Health of the Republic of Guinea (protocol No. 129/CNERS/16 of August 31, 2015). 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, July 23, 2010). The study was approved by the Bioethics Commission of the Russian Anti-Plague Institute "Microbe" (Protocol No. 8 of November 11, 2023).

Acknowledgement. The authors are grateful to the management and staff of the Viral Hemorrhagic Fever Laboratory (Conakry), the regional hospitals of Conakry, Boké, Boffa, Coyah, Mamou, Kindia, Labé, Nzérékoré, Kankan, Dabola, Dalaba, Faranah, and the Institute of Applied Biology of Guinea (Kindia) and the Institute of Medical Veterinary Medicine (Dalaba) (Republic of Guinea) for their help in collecting the material.

Funding source. The research was conducted within the framework of the orders of the Government of the Russian Federation No. 1448-r dated July 25, 2015, No. 2904-r dated December 22, 2017 and No. 2985-r dated November 14, 2020 on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

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

For citation: Naidenova E.V., Zakharov K.S., Agafonov D.A., Kartashov M.Yu., Senichkina A.M., Khalilov E.S., Ibrahim A.B., Bah M.B., Nouridine I., Tokarevich N.K., Boumbaly S., Sidime Y., Shcherbakova S.A., Kutuyev V.V. Current data on the circulation of the Q fever pathogen in the Republic of Guinea. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):606–618.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-557>

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

Введение

Лихорадка Ку, или коксиеллёз, — общее для человека и животных природно-очаговое заболевание, этиологическим агентом которого являются бактерии *Coxiella burnetii* (семейство *Legionellaceae*, класс *Gammaproteobacteria*), характеризующееся полиморфизмом клинической картины у человека и разнообразными механизмами передачи возбудителя. В природных очагах основным переносчиком *C. burnetii* считаются иксодовые, реже аргасовые клещи, а резервуаром — дикие млекопитающие, среди сельскохозяйственных животных — мелкий (МРС) и крупный рогатый скот (КРС) [1, 2].

Заболевание у людей протекает в виде лихорадки с общетоксическими симптомами с возможным переходом в хроническую форму. В связи с широким распространением инфекции, многообразием путей передачи (контактный, пищевой, воздушно-пылевой) лихорадка Ку представляет важную медико-социальную проблему во всём мире.

Помимо этого данная инфекционная болезнь имеет и важное ветеринарное значение, т. к. вызывает репродуктивные нарушения (аборты и мертворождения) у КРС и МРС, что влечёт значительные экономические потери, особенно в тех регионах, где животноводство является основной отраслью сельскохозяйственного производства [2].

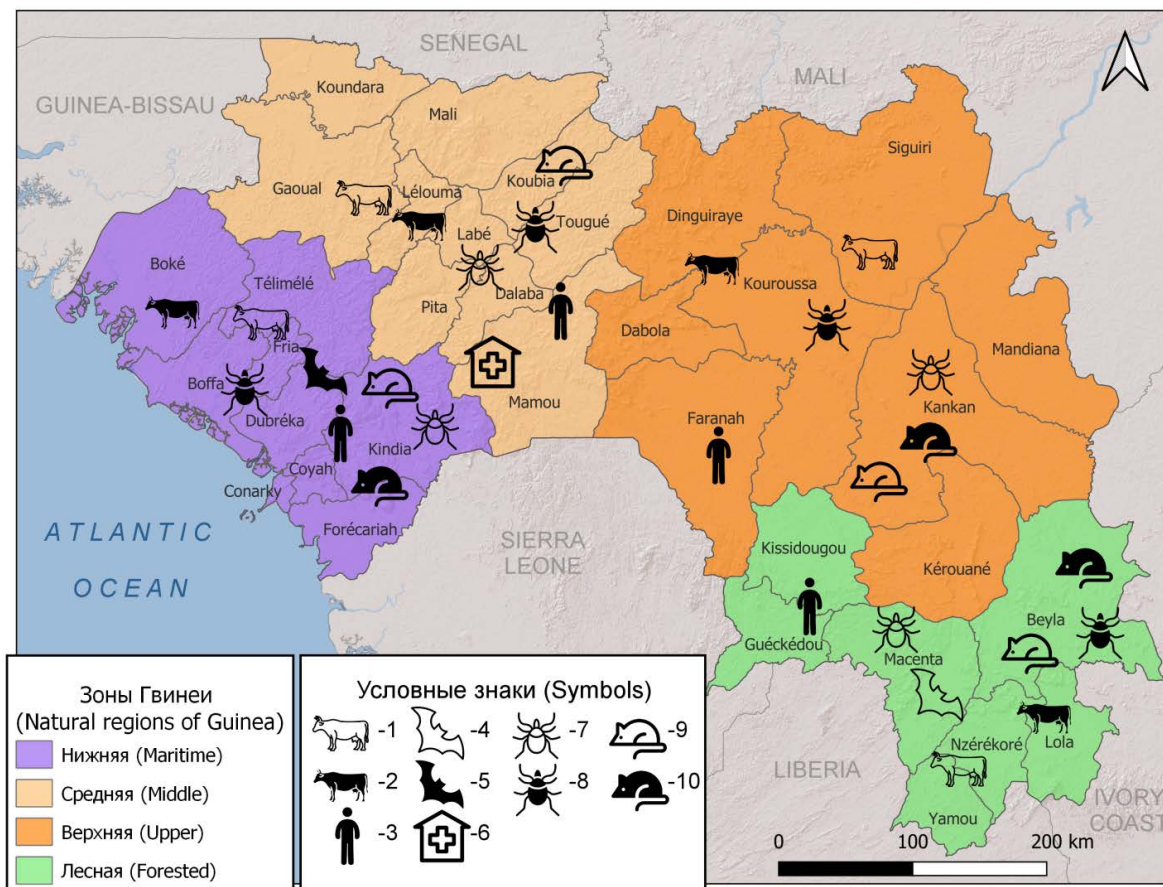
Коксиеллёз является одним из наиболее изученных зоонозов на территории Африки. Появляются новые свидетельства того, что инфицирование *C. burnetii* является причиной лихорадочных заболеваний, не связанных с малярией, и внебольничной пневмонии во многих африканских странах. Однако современные сведения о заболеваемости лихорадкой Ку и циркуляции *C. burnetii* на этом континенте являются ограниченными и неоднородными [3].

Имеющиеся публикации о предыдущих исследованиях указывают на достаточно высокий уровень выявления специфических антител к возбудителю у населения некоторых африканских стран [4–9]. Например, при исследовании образцов сывороток крови жителей отдельных населённых пунктов региона Син-Салум (Республика Сенегал) показано, что специфические антитела к *C. burnetii* были выявлены в 3,7–24,8% образцов (в зависимости от места проживания обследуемых лиц) [5]. Схожие данные получены при проведении иммуносерологического мониторинга в общинах скотоводов в округе Марсабит на севере Кении, когда положительные результаты были получены в 13,2% случаев [6]. Вероятность выявления иммунологических маркеров у мужчин в Кении была значительно выше, чем у женщин [7].

Показано, что племена скотоводов подвержены наиболее высокому риску заражения коксиеллёзом из-за их кочевого образа жизни и хорошо сохранившихся традиций, которые повышают вероятность употребления в пищу некипячённых молочных продуктов и сырого мяса инфицированных животных. Не исключено также, что заражение происходит при контакте с мочой, фекалиями, кровью заражённых животных, а также околородными водами после аборта или доношенных родов [6–9].

Известно и то, что лихорадка Ку вызывает значительные потери среди не только сельскохозяйственных, но и диких животных: антилоп, жирафов, львов и гепардов, нанося непоправимый урон численности этих редких млекопитающих [10].

Данная инфекционная болезнь приобретает актуальность и в качестве «болезни путешественников» в связи с популяризацией Африканского континента и стремительно развивающимся туризмом на данной территории. В литературе описана



Ландшафтно-географические зоны Гвинеи, где были выявлены маркеры возбудителя лихорадки Ку.

1 — ДНК в сыворотках крови КРС; 2 — IgG в сыворотках крови КРС; 3 — IgG в сыворотках крови жителей; 4 — ДНК в суспензиях органов рукокрылых; 5 — антигены в суспензиях органов рукокрылых; 6 — случаи заболевания людей; 7 — ДНК в суспензиях иксодовых клещей; 8 — антигены в суспензиях иксодовых клещей; 9 — ДНК в суспензиях органов мелких млекопитающих; 10 — антигены в суспензиях органов мелких млекопитающих.

Landscape and geographical zones of the Republic of Guinea, where markers of the Q fever pathogen were identified.

1 — DNA in blood sera of cattle; 2 — IgG antibodies in blood sera of cattle; 3 — IgG antibodies in blood sera of residents; 4 — DNA in suspensions of bat organs; 5 — antigens in suspensions of bat organs; 6 — cases of human disease; 7 — DNA in suspensions of ixodes ticks; 8 — antigens in suspensions of ixodes ticks; 9 — DNA in suspensions of organs of small mammals; 10 — antigens in suspensions of organs of small mammals.

вспышка лихорадки Ку, когда во время сафари в природном парке Кении из 50 участников туристического маршрута 4 (8%) подверглись заражению, что стало причиной завозных случаев на территорию Европы [11].

Большинство опубликованной в открытой печати информации по изучению циркуляции возбудителя лихорадки Ку относится к странам Восточной Африки. О ситуации в западной части континента сведений гораздо меньше. Имеются данные об исследованиях, проводимых в природных очагах кокциллёза, Гане, Нигерии, Мали [12–14], а также в Сенегале, где в 2023 г. в пробах от мелких млекопитающих были выявлены два новых генотипа *Coxiella burnetii*, патогенность которых ещё предстоит изучить [15].

Гвинеи́йская Респу́блика расположена в Западной Африке, на побережье Атлантического океана. Население страны, по данным на конец марта

2024 г., составляет около 14,5 млн человек¹. Территория государства на основании географических и природно-климатических признаков условно разделена на 4 ландшафтно-географические зоны: Нижнюю (Приморскую), Среднюю, Верхнюю и Лесную (рисунок) [16].

В 1980–1990 гг. на базе Советско-Гвинеи́йской научно-исследовательской вирусологической и микробиологической лаборатории было проведено достаточно большое количество исследований с целью изучения распространения возбудителя лихорадки Ку на территории Гвинеи́йской Республики, в том числе получены данные об иммунной прослойке населения страны и выявлены специфические антитела в сыворотках крови сельскохозяйственных животных [17]. В последующие десятилетия,

¹ Countrymeters. Население Гвинеи.
 URL: <http://countrymeters.info/ru/guinea>

в силу сложившихся экономических и политических условий, исследования были приостановлены, а значимость лихорадки Ку в общей структуре заболеваемости так и не определена. В 2017 г. в рамках работы Российско-Гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (далее — Центр), созданном на основании распоряжений Правительства РФ на территории Института прикладной биологии Гвинеи (г. Киндиа), исследования были продолжены [18–20].

Цель работы — получение современных данных о распространении *C. burnetii* и особенностей природных очагов лихорадки Ку на территории различных ландшафтно-географических зон Гвинеи.

Материалы и методы

Сбор образцов клинического и биологического материала и последующую диагностическую работу проводили на базе лаборатории Центра российские и гвинейские специалисты, руководствуясь требованиями санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Сыворотка крови людей

Сыворотка крови практически здоровых людей была собрана в региональных госпиталях Гвинеи местными специалистами. Забор крови производили в утренние часы натощак из локтевой вены в количестве 5–10 мл в одноразовую стерильную вакуумную пробирку с активатором образования густка с соблюдением правил асептики.

Далее полученные образцы доставляли в лабораторию Центра с соблюдением правил биологической безопасности и температурного режима. Все образцы сыворотки предварительно исследовали методом иммунохроматографического анализа для обнаружения антигенов малярийных плазмодиев с набором реагентов «SDBIOLINE Malaria Ag P.f./Pan» («Standart Diagnostics, Inc.»). Для исключения вероятности неспецифических реакций образцы, содержащие антигены возбудителей малярии, в последующие исследования не вошли.

Для изучения иммунной прослойки населения Гвинеи к возбудителю лихорадки Ку была составлена панель из 3156 сывороток крови практически здоровых людей, проживающих во всех 4 ландшафтно-географических зонах страны. В работу были включены представители разных возрастных групп: 1519 (48,2%) женщин и 1637 (51,8%) мужчин. Работу проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к антигенам *Coxiella burnetii*» (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия). Сыворотки исследовали в разведении 1 : 100.

Для выяснения возможности заболевания людей лихорадкой Ку были собраны и исследованы 332 сыворотки крови лихорадящих больных, обратившихся за медицинской помощью в региональные госпитали Гвинеи с жалобами на продолжительную лихорадку и другими симптомами, не исключающими коксиеллёз. Сбор материала также проводили гвинейские специалисты по вышеописанной методике. Для проведения исследований молекулярно-генетическими методами кровь также отбирали в количестве 5–10 мл в одноразовую стерильную вакуумную пробирку с 3,8% цитратом натрия.

Образцы исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью выявить ДНК *C. burnetii* с набором реагентов «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) и ИФА с использованием диагностического препарата «*Coxiella burnetii* ELISA IgM» («Vircell») для определения антител класса IgM к возбудителю.

Исследование проб клинического и биологического материала от людей проводили при информированном согласии пациентов, для несовершеннолетних — с разрешения родителей (официальных представителей). Протокол исследования одобрен решением Национального этического комитета Министерства здравоохранения Гвинейской Республики (протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015).

Сыворотка крови сельскохозяйственных животных

Образцы крови получали на скотобойнях, используя общепринятую методику, от взрослых животных (возраст более 1,5 года) без признаков инфекционных заболеваний после их осмотра ветеринарным врачом. Всего для работы была сформирована панель из 1074 образцов крови КРС. Полученные сыворотки тестировали методами ИФА и ПЦР с использованием наборов реагентов для выявления специфических антител класса IgG к *C. burnetii* «ID Screen Q Fever Indirect Multi-species» («ID Screen»), который рекомендован в качестве ветеринарного препарата, и ДНК *C. burnetii* — «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия).

Суспензии клещей

Сбор иксодовых клещей осуществляли на территории всех 4 ландшафтно-географических зон Гвинеи. Эктопаразитов снимали вручную, используя средства индивидуальной защиты, с людей, сельскохозяйственных животных, домашних и безнадзорных собак и кошек, мелких млекопитающих, рептилий. Всего за время проведения исследований было собрано 4709 экземпляров клещей, которых на основании морфологических признаков отнесли к 11 видам: *Amblyomma variegatum* Fabricius, 1794;

Haemaphysalis leachi Audouin, 1826; *Hyalomma rufipes* Koch, 1844; *Hyalomma truncatum* Koch, 1844; *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* Koch, 1844; *Rhipicephalus (Boophilus) geigy* Aeschliman & Morel, 1965; *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* Say, 1821; *Rhipicephalus (Boophilus) microphilus* Canestrini, 1888; *Rhipicephalus lunulatus* Neumann, 1907; *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806; *Rhipicephalus senegalensis* Koch, 1844, согласно определителю [21]. Далее с учётом вида, пола, фазы развития и упитанности отдельных особей клещей, а также мест сбора эктопаразитов, было сформировано 1648 пулов. Эктопаразитов дважды отмывали 70% этанолом для удаления внешних загрязнений и наружной микрофлоры. Подготовку проб для исследования проводили с использованием лабораторного гомогенизатора «TissueLyser II» («Qiagen») в 500 мкл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора.

Полученный материал был протестирован методами ПЦР и ИФА с использованием набора реагентов «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии) и тест-системы иммуноферментной для выявления антигенов коксиелл Бернета «ИФА-Ку-антиген (комплект N1)» (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера) соответственно. Часть проб, содержащих и ДНК, и антигены *C. burnetii*, исследованы с использованием высокопроизводительного секвенирования на платформе «Ion S5» («Thermo Scientific»), далее прочтения картировались на последовательность 16S рРНК из базы NCBI GenBank с помощью алгоритма BWA [22]. Изучен также плазмидный профиль со специфическими примерами к локусам плазмид QpH1, QpRS и QpDV.

Суспензии органов мелких млекопитающих

При проведении эпизоотологического мониторинга на территории Гвинеи отловлено 319 экземпляров мелких млекопитающих (*Rodentia*, *Eulipotyphla*). Видовой спектр грызунов представлен 13 видами: *Arvicanthis ansorgei* Thomas, 1910 (суданская травяная мышь); *Heliosciurus gambianus* Ogibly, 1835 (гамбийская белка); *Cricetomys gambianus* Waterhouse, 1840 (гамбийская хомяковидная крыса); *Lemniscomys striatus* Linnaeus, 1758 (полосатая мышь); *Lophuromys sikapusi* Temminck, 1853 (ржавобрюхая жесткошёрстная мышь); *Mastomys erythroleucus* Temminck, 1853 (гвинейская многососковая мышь); *Mastomys natalensis* A. Smith, 1834 (натальская мышь); *Mus minutoides* A. Smith, 1834 (карликовая мышь); *Mus musculoides* Temminck, 1853 (Темминкова мышь); *Praomys daltoni* Thomas, 1892 (мышь Дальтона); *Rattus rattus* Linnaeus, 1758 (чёрная крыса); *Crocidura olivieri* Lesson, 1827 (африканская гигантская белозубка); *Crocidura* sp. Wagler, 1832 (белозубки) [23–26].

Добыто 298 экземпляров рукокрылых (*Chiroptera*) 14 видов: *Eidolon helvum* Kerr, 1792 (пальмовый крылан); *Epomophorus gambianus* Ogilby, 1835 (большой эполетовый крылан); *Lissonycteris angolensis* Vocage, 1898 (ангольская летучая собака); *Rousettus aegyptiacus* E. Geoffroy, 1810 (египетская летучая собака); *Chaerephon pumillus* Cretzschmar, 1830 (карликовый складчатогуб); *Mops condylurus* A. Smith, 1833 (ангольский складчатогуб); *Hipposideros caffer* Sundevall, 1846 (южноафриканский листонос); *Hipposideros jonesi* Hayman, 1947 (листонос Джонса); *Hipposideros ruber* Noack, 1893 (красный листонос); *Nycteris hispida* Schreber, 1775 (мохнатый щелеморд); *Neoromicia guineensis* Vocage, 1889 (гвинейский кожан); *Scotophilus danganii* A. Smith, 1833 (африканский гладконос); *Scotophilus leucogaster* Cretzschmar, 1830 (белобрюхий домовый гладконос); *Rhinolophus alcyone* Temminck, 1853 (ганский подковонос) [23–26].

Млекопитающих вскрывали с соблюдением правил биологической безопасности не позднее чем через 3 ч после отлова. При отсутствии такой возможности тушки животных замораживали при -20°C и доставляли в лабораторию, где в последующем вскрывали и отбирали образцы органов. В качестве материала для работы служили объединённые суспензии лёгких и почек, в которых проводили поиск маркеров возбудителя коксиеллёза (ДНК и антигенов) с упомянутыми выше наборами реагентов.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010). Исследование одобрено комиссией по биоэтике Российского противочумного института «Микроб» (протокол № 8 от 21.11.2023).

При статистической обработке материала рассчитывали долю выявленных маркеров возбудителей в каждой выборке, 95% доверительные интервалы (ДИ) для долей по методу Уилсона.

Результаты и обсуждение

Выявление случая заболеваний людей лихорадкой Ку в Гвинее

До настоящего времени выявление больных с подозрением на лихорадку Ку на территории Гвинеи не проводилось. Это можно объяснить тем, что отсутствует настороженность медицинских работников в местных госпиталях в отношении данной инфекционной болезни. В связи с этим большой интерес представляет случай заболевания, впервые зарегистрированный на территории страны.

Пациентка Д., 28 лет, проживающая в г. Маму (Средняя Гвинея), поступила в инфекционное отделение регионального госпиталя. При госпитализации у больной отмечались затяжная (более 1 мес)

Таблица 1. Выявление специфических антител класса IgG к возбудителю лихорадки Ку в сыворотках крови жителей Гвинеи**Table 1.** Identification of specific IgG antibodies to the Q fever pathogen in the blood sera of residents of the Republic of Guinea

Возраст, лет Age, years	Количество образцов Number of samples						
	всего total	мужчины men			женщины women		
		всего total	положительных positive	% (95% ДИ 95% CI)	всего total	положительных positive	% (95% ДИ 95% CI)
< 10	197	108	8	7,4 (3,8–13,9)	89	6	6,7 (3,1–13,9)
10–20	498	275	26	9,4 (6,5–13,4)	223	27	12,1 (8,4–17,0)
20–30	699	340	32	9,4 (6,7–12,9)	359	29	8,1 (5,7–11,4)
30–40	595	300	39	13,0 (9,7–17,3)	295	33	11,2 (8,1–15,3)
40–50	559	285	35	12,3 (8,9–16,6)	277	29	10,5 (7,4–14,6)
50–60	339	230	37	16,1 (11,9–21,4)	109	26	23,8 (16,8–32,6)
> 70	269	102	20	19,6 (13,1–28,3)	167	19	11,4 (7,4–17,1)
Всего Total	3156	1637	197	12,1 (10,5–13,7)	1519	169	11,3 (9,6–12,8)

субфебрильная лихорадка, мышечные и суставные боли, затруднённое дыхание. Результаты анализа на выявление возбудителей малярии, проведённого методами иммунохроматографического анализа и микроскопии, были отрицательными.

Для проведения дальнейшей дифференциальной диагностики сыворотка крови больной направлена в лабораторию Центра. Полученный материал исследовали методом ПЦР с обратной транскрипцией с целью выявления РНК вирусов Эбола, жёлтой лихорадки, Западного Нила, денге, Зика, Крымской-Конго геморрагической лихорадки, гепатита С, 16S РНК возбудителей лептоспироза, ДНК вируса гепатита В, возбудителей лихорадки Ку и риккетсиозов. По результатам работы в сыворотке крови пациентки обнаружена ДНК *S. burnetii*. Также материал протестирован с использованием ИФА, выявлены специфические антитела класса IgM к коксиеллам в титре 1 : 400. В последующем полученный образец крови использовали для определения нуклеотидной последовательности ДНК возбудителя лихорадки Ку. При проведении частичного секвенирования со специфическими праймерами выявлена 99% идентичность исследуемого образца с геномом *S. burnetii*. Филогенетический анализ с помощью алгоритма BLAST² показал 96% гомологии со штаммами, выделенными в Намибии.

При опросе больная Д. упоминала тесный контакт с сельскохозяйственными животными, в частности с КРС, находящимся в собственности, а также указала, что в деревне, где проживала пациентка, были отмечены случаи спонтанных аборт у МРС.

В остальных пробах сывороток крови от лихорадящих больных, доставленных из госпиталей Гвинеи, ни генетические маркеры *S. burnetii*, ни

специфические антитела класса IgM к коксиеллам не выявлены.

Определение уровня иммунной прослойки жителей Гвинеи к возбудителю лихорадки Ку

В настоящем исследовании сывороток крови людей, проживающих в различных зонах Гвинеи, специфические антитела к возбудителю лихорадки Ку, относящиеся к классу IgG, выявлены во всех возрастных группах, при этом зависимости уровня иммунной прослойки от половой принадлежности обследованных лиц не наблюдалось (табл. 1). В целом по стране специфические иммуноглобулины к *S. burnetii* были зарегистрированы в 366 из 3156 образцов сыворотки крови, что составило 11,6% (95% ДИ 10,5–12,8).

Определение уровня иммунной прослойки сельскохозяйственных животных к возбудителю лихорадки Ку

Одним из показателей циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней на определённой территории является выявление специфических иммуноглобулинов класса G в сыворотках крови сельскохозяйственных животных, обитающих в данном регионе.

В результате данной работы антитела к возбудителю лихорадки Ку выявлены в 172 образцах, что составило 16,0% (95% ДИ 13,9–18,3). Положительные результаты зарегистрированы во всех ландшафтно-географических зонах.

Выявление специфических маркеров (ДНК и антигены) возбудителя лихорадки Ку в суспензиях клещей

Методами ПЦР и ИФА исследованы суспензии иксодовых клещей различных видов, являющихся

² URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

основными переносчиками *C. burnetii*, которые были собраны во всех ландшафтно-географических зонах Гвинеи. ДНК возбудителя выявлена в 294 (17,9%) пробах, антиген — в 307 (18,7%) (табл. 2). Положительные находки отмечались среди всех видов иксодовых клещей, представленных в работе, но большинство относились к *Am. variegatum*, *Hu. truncatum*, *Rh. decoloratus* (табл. 2).

Анализ плазмидных профилей является важным инструментом для изучения распространения лихорадки Ку и определения типа возбудителя. Для проведения генетического типирования *C. burnetii* была создана панель из 20 проб, представленных разными видами клещей, в которых выявлены одновременно и ДНК (уровень ст не более 15), и антиген возбудителя. Методом ПЦР со специфическими праймерами к локусам плазмид QpH1, QpRS и QpDV в 5 образцах выявлено наличие только QpH1. Последовательности фрагментов плазмид QpRS и QpDV ни в одной пробе не выявлено. В ходе анализа полученных результатов и данных литературы установлено, что штаммы, несущие плазмиду QpH1, широко распространены на территории стран Экваториальной Африки и способны вызывать заболевания у людей и животных [27, 28], что не исключает возможность их циркуляции и на территории Гвинеи.

Сформированная панель образцов была проанализирована с использованием методов высокопроизводительного секвенирования на платформе «Ion S5» («Thermo Scientific»). В результате работы в 8 пробах определена нуклеотидная последовательность 16S рРНК возбудителя лихорадки Ку, которая на 99,9% совпадает с референсным штаммом,

представленным в базе данных NCBI GenBank. При сравнении полученной консенсусной последовательности с базой NCBI BLAST обнаружены штаммы *C. burnetii*, выделенные в Намибии, показавшие гомологию (96%) с исследуемым образцом. Дополнительно полученные прочтения классифицировались алгоритмом kraken2 с использованием базы 16S РНК Greengenes, что также показало принадлежность исследуемого образца к виду *C. burnetii*. Часть полученных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК с наиболее высоким качеством прочтения были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами OQ152497–OQ152500.

Выявление специфических маркеров (ДНК и антигены) возбудителя лихорадки Ку в суспензиях органов мелких млекопитающих

В результате исследований методами ПЦР и ИФА маркеры возбудителя лихорадки Ку были выявлены в материале, собранном во всех зонах Гвинеи. Антиген обнаружен в 0,9% проб, ДНК — в 5,1%. Максимальное количество положительных находок было получено при исследовании материала от грызунов вида *Mastomys erythroleucus* (табл. 3). Данные сведения могут свидетельствовать об участии животных этой систематической группы в распространении *C. burnetii* на территории Гвинеи.

Выявление специфических маркеров (ДНК и антигены) возбудителя лихорадки Ку в суспензиях органов рукокрылых

При исследовании объединённых проб лёгких и почек, полученных от рукокрылых, были выявлены как антигены (в 1% случаев), так и ДНК

Таблица 2. Выявление маркеров *C. burnetii* в суспензиях иксодовых клещей разных видов, собранных на территории Гвинеи

Table 2. Identification of *C. burnetii* markers in suspensions of ixodid ticks of different species collected in the territory of the Republic of Guinea

Вид клещей Tick species	Количество проб (экземпляров) Number of samples (copies)	Количество положительных проб; % (95% ДИ) The number of positive samples; % (95% CI)	
		ПЦР PCR	ИФА ELISA
<i>Am. variegatum</i>	872 (2493)	159; 18,2 (15,8–20,9)	193; 22,1 (19,5–25,0)
<i>Ha. leachi</i>	16 (56)	0	0
<i>Hu. truncatum</i>	52 (95)	14; 26,9 (16,8–40,3)	16; 30,8 (19,9–44,3)
<i>Rh. annulatus</i>	58 (161)	36; 62,1 (49,2–73,4)	29; 50 (37,5–62,5)
<i>Rh. decoloratus</i>	391 (1104)	47; 12 (9,2–15,6)	37; 9,5 (6,9–12,8)
<i>Rh. geigy</i>	210 (668)	36; 17,1 (12,7–22,8)	29; 13,8 (9,8–19,1)
<i>Rh. microplus</i>	18 (47)	0	1; 5,6 (1,0–25,8)
<i>Rh. sanguineus</i>	10 (42)	0	1; 10 (1,8–40,4)
<i>Rh. senegalensis</i>	18 (29)	2; 11,1 (3,1–32,8)	1; 5,6 (1,0–25,8)
<i>Rh. lunulatus</i>	2 (11)	0	0
<i>Hu. rufipes</i>	1 (3)	0	0
Всего Total	1648 (4709)	294; 17,8 (16,1–19,8)	307; 18,6 (16,8–20,6)

Таблица 3. Выявление маркеров *C. burnetii* в суспензиях органов мелких млекопитающих разных видов, собранных на территории Гвинеи**Table 3.** Identification of *C. burnetii* markers in suspensions of organs of small mammals of different species collected on the territory of the Republic of Guinea

Вид мелких млекопитающих Small mammal species	Количество проб (экземпляров) Number of samples (copies)	Количество положительных проб; % (95% ДИ) The number of positive samples; % (95% CI)	
		ПЦР PCR	ИФА ELISA
<i>Arvicanthis ansorgei</i>	3	0	0
<i>Heliosciurus gambianus</i>	4	0	0
<i>Cricetomys gambianus</i>	7	1; 14,3 (2,6–51,3)	0
<i>Lemniscomys striatus</i>	3	0	0
<i>Lophuromys sikapusi</i>	1	0	0
<i>Mastomys erythroleucus</i>	124	8; 6,5 (3,3–12,2)	2; 1,6 (0,4–5,7)
<i>Mastomys natalensis</i>	32	2; 6,3 (1,7–20,1)	0
<i>Mus minutoides</i>	5	0	0
<i>Mus musculooides</i>	16	1; 6,3 (1,1–28,3)	0
<i>Praomys daltoni</i>	6	0	0
<i>Rattus rattus</i>	96	4; 4,2 (1,6–10,2)	1; 1,0 (0,2–5,7)
<i>Crocidura olivieri</i>	7	0	0
<i>Crocidura sp.</i>	15	0	0
Всего Total	319	16; 5,0 (3,1–8,0)	3; 0,9 (0,3–2,7)

C. burnetii (2%). Большинство положительных проб сформированы из органов *Scotophilus leucogaster* (табл. 4). Представители этого вида широко распространены на территории всей Африки южнее Сахары. Полученные данные подтверждают роль

рукокрылых в циркуляции возбудителя лихорадки Ку, что свидетельствует о необходимости проведения дополнительных исследований для определения роли этих млекопитающих в экологии возбудителя.

Таблица 4. Выявление маркеров *C. burnetii* в суспензиях органов рукокрылых разных видов, собранных на территории Гвинеи**Table 4.** Identification of *C. burnetii* markers in organ suspensions of bats of various species collected on the territory of the Republic of Guinea

Виды рукокрылых Bat species	Количество проб (экземпляров) Number of samples (copies)	Количество положительных проб; % (95% ДИ) The number of positive samples; % (95% CI)	
		ПЦР PCR	ИФА ELISA
<i>Eidolon helvum</i>	1	0	0
<i>Epomophorus gambianus</i>	4	0	0
<i>Lissonycteris angolensis</i>	4	0	0
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	15	0	0
<i>Chaerephon pumillus</i>	3	0	0
<i>Mops condylurus</i>	26	1; 3,8 (0,7–18,9)	0
<i>Hipposideros caffer</i>	32	0	0
<i>Hipposideros jonesi</i>	25	0	0
<i>Hipposideros ruber</i>	41	1; 2,4 (0,4–12,6)	1; 2,4 (0,4–12,6)
<i>Nycteris hispida</i>	5	0	0
<i>Neoromicia guineensis</i>	23	1; 4,3 (0,8–21,0)	0
<i>Scotophilus dinganii</i>	1	0	0
<i>Scotophilus leucogaster</i>	117	3; 2,6 (0,9–7,3)	2; 1,7 (0,5–6,0)
<i>Rhinolophus alcyone</i>	1	0	0
Всего Total	298	6; 2,0 (0,9–4,3)	3; 1,0 (0,3–2,9)

Таблица 5. Выявление маркеров возбудителя лихорадки Ку в различном материале, собранном на территории Гвинейской Республики
Table 5. Identification of markers of the Q fever pathogen in various materials collected on the territory of the Republic of Guinea

Вид исследуемого материала Type of the studied samples	Количество проб Number of samples	Количество положительных проб; % (95% ДИ) The number of positive; % (95% CI)		
		ПЦП PCR	ИФА ELISA	
		ДНК DNA	антиген antigen	IgG
Нижняя (Приморская) Гвинея Lower (Maritime) Guinea				
Сыворотка крови практически здоровых людей Blood serum of practically healthy people	943	Н. и. N. i.	Н. и. N. i.	106; 11,2 (9,4–13,4)
Сыворотка крови КРС Blood serum of cattle	371	6; 1,6 (0,7–3,5)	Н. и. N. i.	64; 17,2 (13,7–21,4)
Суспензии клещей Suspensions of ticks	624	111; 17,8 (15,0–21,0)	131; 21,0 (18,0–24,4)	Н. и. N. i.
Суспензии органов мелких млекопитающих Suspensions of organs of small mammals	149	8; 5,4 (2,7–10,2)	0; 0 (0–2,5)	Н. и. N. i.
Суспензии органов рукокрылых Suspensions of bat organs	107	0; 0 (0–3,4)	3; 2,8 (0,9–7,9)	Н. и. N. i.
Средняя Гвинея Middle Guinea				
Сыворотка крови практически здоровых людей Blood serum of practically healthy people	778	Н. и. N. i.	Н. и. N. i.	82; 10,5 (8,6–12,8)
Сыворотка крови КРС Blood serum of cattle	257	3; 1,2 (0,4–3,4)	Н. и. N. i.	49; 19,2 (14,7–24,3)
Суспензии клещей Suspensions of ticks	402	71; 17,7 (14,2–21,7)	77; 19,1 (15,6–23,3)	Н. и. N. i.
Суспензии органов мелких млекопитающих Suspensions of organs of small mammals	55	3; 5,4 (1,9–14,8)	0; 0 (0–6,5)	Н. и. N. i.
Суспензии органов рукокрылых Suspensions of bat organs	61	0; 0 (0–5,8)	0; 0 (0–5,8)	Н. и. N. i.
Верхняя Гвинея Upper Guinea				
Сыворотка крови практически здоровых людей Blood serum of practically healthy people	655	Н. и. N. i.	Н. и. N. i.	77; 11,8 (9,5–14,4)
Сыворотка крови КРС Blood serum of cattle	182	2; 1,1 (0,3–3,9)	Н. и. N. i.	35; 13,2 (9,6–17,8)
Суспензии клещей Suspensions of ticks	245	53; 21,6 (16,9–27,2)	28; 0,8 (0,3–2,9)	Н. и. N. i.
Суспензии органов мелких млекопитающих Suspensions of organs of small mammals	43	2; 4,6 (1,3–15,4)	1; 2,3 (0,4–12,1)	Н. и. N. i.
Суспензии органов рукокрылых Suspensions of bat organs	54	0; 0 (0–6,6)	0; 0 (0–6,6)	Н. и. N. i.
Лесная Гвинея Forest Guinea				
Сыворотка крови практически здоровых людей Blood serum of practically healthy people	780	Н. и. N. i.	Н. и. N. i.	101; 12,9 (10,7–15,5)
Сыворотка крови КРС Blood serum of cattle	264	3; 1,1 (0,4–3,3)	Н. и. N. i.	35; 13,2 (9,6–17,8)
Суспензии клещей Suspensions of ticks	377	59; 15,6 (12,3–19,7)	61; 16,2 (12,8–20,2)	Н. и. N. i.
Суспензии органов мелких млекопитающих Suspensions of organs of small mammals	72	3; 4,2 (1,4–11,5)	2; 2,8 (0,8–9,5)	Н. и. N. i.
Суспензии органов рукокрылых Suspensions of bat organs	76	6; 7,9 (3,7–16,1)	0; 0 (0–4,8)	Н. и. N. i.
Общее по стране General by country				
Сыворотка крови практически здоровых людей Blood serum of practically healthy people	3156	Н. и. N. i.	Н. и. N. i.	366; 11,6 (10,5–12,7)
Сыворотка крови КРС Blood serum of cattle	1074	14; 1,3 (0,8–2,1)	Н. и. N. i.	172; 16,0 (13,9–18,3)
Суспензии клещей Suspensions of ticks	1648	294; 17,8 (16,1–19,8)	307; 18,6 (16,8–20,6)	Н. и. N. i.
Суспензии органов мелких млекопитающих Suspensions of organs of small mammals	319	16; 5,0 (3,1–8,0)	3; 0,9 (0,3–2,7)	Н. и. N. i.
Суспензии органов рукокрылых Suspensions of bat organs	298	6; 2,0 (0,9–4,3)	3; 1,0 (0,3–2,9)	Н. и. N. i.

Примечание. Н. и. — не исследовали.
Note. N. i. — not investigated.

Заклучение

В результате работы проведено изучение распространения *C. burnetii* на территории всех ландшафтно-географических зон Гвинеи, в том числе впервые выявлен и лабораторно подтверждён случай заболевания человека лихорадкой Ку (табл. 5). Установлена роль сельскохозяйственных животных, мелких млекопитающих и рукокрылых в циркуляции *C. burnetii*. Показано, что основными переносчиками возбудителя на территории Гвинеи являются иксодовые клещи видов *Am. variegatum*, *Hu. truncatum* и *Rh. decoloratus*. При проведении молекулярно-генетических исследований материала, собранного в Гвинею, выявлены штаммы *C. burnetii*, несущие плазмиду QpN1, которые способны вызывать заболевания у людей и животных, и впервые для данного региона определена и зарегистрирована в международной базе данных GenBank полная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК возбудителя лихорадки Ку.

Наше исследование позволило расширить данные о циркуляции и распространении *C. burnetii* в Западной Африке. Актуальной задачей остаётся изучение особенностей циркуляции *C. burnetii* на территории Гвинеи. Систематически получаемые сведения о выявлении возбудителя и оценка факторов риска возникновения вспышек заболеваний, вызываемых коксиеллами, необходимы для разработки алгоритма лабораторной диагностики и составления рекомендаций для врачей-клиницистов. Регулярный мониторинг за распространением лихорадки Ку, проводимый при участии как медицинских, так и ветеринарных служб Гвинеи, позволит прогнозировать эпидемиологическую ситуацию и координировать профилактические (противоэпидемические) мероприятия в рамках концепции «Единое здоровье» (One Health)³.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В., ред. *Специфическая индикация патогенных биологических агентов*. М.; 2014. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., eds. *Specific Indication of Pathogenic Biological Agents*. Moscow; 2014. EDN: <https://elibrary.ru/qlnqhv>
2. Лукин Е.П., Мищенко О.А., Борисевич С.В. Лихорадка Ку в XXI в.: материал для подготовки лекции. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019;8(4):62–77. Lukin E.P., Mishchenko O.A., Borisevich S.V. Ku fever in the XXI century: material for preparing a lecture. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2019;8(4):62–77. DOI: <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-14009> EDN: <https://elibrary.ru/houbuj>
3. Vanderburg S., Rubach M.P., Halliday J.E., et al. Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a OneHealth systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014;8(4):e2787. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002787>
4. Dupont H.T., Brouqui P., Faugere B., Raoult D. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, and *Rickettsia typhi* in seven African countries. *Clin. Infect. Dis.* 1995;21(5):1126–33. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinids/21.5.1126>
5. Mediannikov O., Fenollar F., Socolovschi C., et al. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010;4(4):e654. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000654>
6. Muema J., Nyamai M., Wheelhouse N., et al. Endemicity of *Coxiella burnetii* infection among people and their livestock in pastoral communities in northern Kenya. *Heliyon*. 2022;8(10):e11133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11133>
7. Mwololo D., Nthiwa D., Kitale P., et al. Sero-epidemiological survey of *Coxiella burnetii* in livestock and humans in Tana River and Garissa counties in Kenya. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2022;16(3):e0010214. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010214>
8. Crump J.A., Morrissey A.B., Nicholson W.L., et al. Etiology of severe non-malaria febrile illness in Northern Tanzania: a prospective cohort study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7(7):e2324. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002324>
9. Larson P.S., Espira L., Grabow C., et al. The sero-epidemiology of *Coxiella burnetii* (Q fever) across livestock species and herding contexts in Laikipia County, Kenya. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(3):316–24. DOI: <https://doi.org/10.1111/zph.12567>
10. Mangena M.L., Gcebe N., Thompson P.N., Adesiyun A.A. Q fever and toxoplasmosis in South African livestock and wildlife: a retrospective study on seropositivity, sporadic abortion, and stillbirth cases in livestock caused by *Coxiella burnetii*. *BMC Vet. Res.* 2023;19(1):168. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03645-w>
11. Njeru J., Henning K., Pletz M.W., et al. Febrile patients admitted to remote hospitals in Northeastern Kenya: seroprevalence, risk factors and a clinical prediction tool for Q-Fever. *BMC Infect. Dis.* 2016;16:244. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1569-0>
12. Dione M.M., Séry A., Sidibé C.A.K., et al. Exposure to multiple pathogens — serological evidence for Rift Valley fever virus, *Coxiella burnetii*, *Bluetongue* virus and *Brucella* spp. in cattle, sheep and goat in Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2022;16(4):e0010342. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010342>
13. Addo S.O., Bentil R.E., Baako B.O.A., et al. Occurrence of *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii* in ixodid ticks in Kassena-Nankana, Ghana. *Exp. Appl. Acarol.* 2023;90(1-2):137–53. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00808-0>
14. Kamani J., Baneth G., Gutiérrez R., et al. *Coxiella burnetii* and *Rickettsia conorii*: Two zoonotic pathogens in peridomestic rodents and their ectoparasites in Nigeria. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9(1):86–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.004>
15. Mangombi-Pambou J., Granjon L., Labarrere C., et al. New genotype of *Coxiella burnetii* causing epizootic q fever outbreak in rodents, Northern Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 2023;29(5):1078–81. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2905.221034>
16. Черч Гаррисон Р.Дж. *Западная Африка. Природная среда и ее хозяйственное использование*. М.;1959. Church Harrison R.J. *West Africa. A study of the environment and of man's use of it*. New York;1957.
17. Каливоги С., Буаро М.Е., Константинов О.К., Плотникова Л.Ф. Иммунная структура населения и домашних животных Гвинейской Республики в отношении риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки и лихорадки Ку. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2013;(1):28–30. Kalivogi S., Boiro M.E., Konstantinov O.K.,

³ WHO. One health. URL: https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1 (дата обращения: 26.05.2024).

- Plotnikova L.F. The immune structure of the population and domestic animals of the Republic of Guinea in relation to rickettsioses of the tick-borne spotted fever and Ku fever group. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 2013;(1):28–30. EDN: <https://elibrary.ru/tvzcbv>
18. Найденнова Е.В., Каливоги С., Карташов М.Ю. и др. Новые данные об уровне иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к возбудителю лихорадки Ку. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(1):165–70. Naidenova E.V., Kalivogui S., Kartashov M.Y., et al. New data on the level of immune stratum against Q fever agent in population of the Republic of Guinea. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(1):165–70. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-NDO-1485> EDN: <https://elibrary.ru/wzxxmv>
19. Найденнова Е.В., Захаров К.С., Карташов М.Ю. и др. Выявление генетических маркеров возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней в пробах иксодовых клещей, собранных на территории Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(4):115–24. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Yu., et al. Genetic Marker Detection of Natural-Focal Infectious Disease Pathogens in Samples of Ixodidae Ticks, Collected on the Territory of the Republic of Guinea. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(4):115–24. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-4-115-124> EDN: <https://elibrary.ru/lnomas>
20. Найденнова Е.В., Карташов М.Ю., Шевцова А.П. и др. Определение уровня иммунной прослойки сельскохозяйственных животных к возбудителям зоонозных инфекционных болезней в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(2):101–6. Naidenova E.V., Kartashov M.Yu., Shevtsova A.P., et al. Identification of the farm animals immune to pathogens of zoonotic infectious diseases in the Republic of Guinea. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(2):101–6. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-2-101-106> EDN: <https://elibrary.ru/bssaaq>
21. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.L., et al. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*. Edinburgh;2014.
22. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14):1754–60. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
23. Wilson D.E., Reeder D.M., eds. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore;2005.
24. Happold D.C.D., ed. *Mammals of Africa. Volume III: Rodents, Hares and Rabbits*. London;2013.
25. Happold M., Happold D.C.D., eds. *Mammals of Africa. Volume IV: Hedgehogs, Shrews and Bats*. London;2013.
26. Соколов В.Е. *Пятиязычный словарь названий животных. Млекопитающие. Латинский — русский — английский — немецкий — французский*. М.;1984. Sokolov V.E. *A Five-Language Dictionary of Animal Names. Mammals. Latin — Russian — English — German — French*. Moscow;1984.
27. Luo S., Lu S., Fan H., et al. The *Coxiella burnetii* QpH1 plasmid is a virulence factor for colonizing bone marrow-derived murine macrophages. *J. Bacteriol*. 2021;203(9):e00588–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00588-20>
28. Панферова Ю.А., Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К. и др. Детекция *Coxiella burnetii* в клещах, собранных с крупного рогатого скота, на территории некоторых провинций Гвинейской Республики. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019;24(5-6):234–9. Panferova Yu.A., Freylikhman O.A., Tokarevich N.K., et al. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from cattle in several provinces of the Republic of Guinea. *Epidemiology and infectious diseases*. 2019;24(5-6): 234–9. EDN: <https://elibrary.ru/twsemw>

Информация об авторах

Найденнова Екатерина Владимировна[✉] — к. б. н., в. н. с. отдела диагностики инфекционных болезней Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, katim2003@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Захаров Кирилл Сергеевич — к. б. н., с. н. с. отдела эпидемиологии инфекционных болезней Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>

Агафонов Дмитрий Алексеевич — к. б. н., с. н. с. отдела диагностики инфекционных болезней Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9273-6063>

Карташов Михаил Юрьевич — к. б. н., с. н. с. отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Сеничкина Айслу Мухаматовна — к. б. н., с. н. с. отдела диагностики инфекционных болезней Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1026-2680>

Халилов Эрик Серкалиевич — м. н. с. лаб. зооантропонозных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0599-4302>

Ибрагим Абдул Бастои — н. с. лаб. вирусных геморрагических лихорадок Гвинеи Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, Киндиа, Гвинейская Республика, <https://orcid.org/0009-0003-2547-8705>

Ба Мамадю Бандикура — н. с. Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, Киндиа, Гвинейская Республика, <https://orcid.org/0000-0002-4565-269X>

Information about the authors

Ekaterina V. Naidenova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of infectious disease diagnostics, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, katim2003@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Kirill S. Zakharov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of infectious disease epidemiology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>

Dmitry A. Agafonov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of infectious diseases, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9273-6063>

Mikhail Yu. Kartashov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Aislu M. Senichkina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of diagnostics of infectious diseases, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1026-2680>

Erik S. Khalilov — junior researcher, Laboratory of zoonotic infections, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0599-4302>

Abdoul B. Ibrahim — researcher, Laboratory of viral hemorrhagic fevers of Guinea, Guinea Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0009-0003-2547-8705>

Mamadou B. Bah — researcher, Guinea Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-4565-269X>

Ibrahim Nourdin — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea; researcher, Laboratory of viral hemorrhagic fevers of Guinea, Virology Research Center, Conakry, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-2970-9676>

Нурдин Ибрагим — к. б. н., н. с. Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, Киндиа, Гвинея; н. с. лаб. вирусных геморрагических лихорадок Гвинеи Исследовательского центра вирусологии, Конакри, Гвинея, <https://orcid.org/0000-0002-2970-9676>

Токаревич Николай Константинович — д. м. н., профессор, зав. лаб. зооантропонозных инфекций Санкт-Петербургского НИИ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6433-3486>

Бумбали Санаба — к. б. н., профессор, консультант Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи, Киндиа, Гвинея; директор лаб. вирусных геморрагических лихорадок Гвинеи Исследовательского центра вирусологии, Конакри, Гвинея, <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Сидиме Юсуф — к. вет. н., профессор, директор Института медицинской ветеринарии, Далаба, Гвинея, <https://orcid.org/0000-0002-0742-0468>

Щербакова Светлана Анатольевна — д. б. н., зам. директора Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Кутырев Владимир Викторович — д. м. н., профессор, академик РАН, директор Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Участие авторов: *Найденова Е.В.* — планирование, организация и проведение исследований, анализ данных литературы, оформление результатов, написание текста статьи; *Захаров К.С.* — проведение исследований, оформление результатов, статистическая обработка данных, подготовка иллюстраций; *Агафонов Д.А.* — проведение исследований, оформление результатов; *Карташов М.Ю.* — проведение исследований, статистическая обработка данных; *Сеничкина А.М.* — проведение исследований; *Халилов Э.С.* — проведение исследований, геномный анализ; *Абдул Б.И.* — сбор и доставка проб биологического материала, проведение исследований; *Ба М.Б.* — сбор и доставка проб биологического материала, проведение исследований; *Токаревич Н.К.* — анализ данных литературы; *Бумбали С.* — организация, сбор и доставка проб биологического материала; *Сидиме Ю.* — организация, сбор и доставка проб биологического материала; *Щербакова С.А.* — руководство исследованиями; *Кутырев В.В.* — общее руководство. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 24.06.2024;
принята к публикации 08.08.2024;
опубликована 30.10.2024

Nikolai K. Tokarevich — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of zoonanthropoноtic infections, Pasteur St. Petersburg Research Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6433-3486>

Sanaba Boubaly — Cand. Sci. (Biol.), Professor, consultant, Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea; Director, Laboratory of viral hemorrhagic fevers of Guinea, Virology Research Center, Conakry, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Sidime Yusuf — Cand. Sci. (Vet.), Professor, Director, Institute of Veterinary Medicine, Dalaba, Republic of Guinea, <https://orcid.org/0000-0002-0742-0468>

Svetlana A. Shcherbakova — D. Sci. (Biol.), Deputy director, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Vladimir V. Kutyrev — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the RAS, Director, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Author contribution: *Naidenova E.V.* — planning, organization and conduct of research, analysis of literature data, presentation of results, writing the text of the article; *Zakharov K.S.* — conducting research, presenting results, statistical processing of data, preparing illustrations; *Agafonov D.A.* — conducting research, presenting results; *Kartashov M.Yu.* — conducting research, statistical processing of data; *Senichkina A.M.* — conducting research; *Khalilov E.S.* — conducting research, genomic analysis; *Abdul B.I.* — collection and delivery of biological material samples, conducting research; *Bah M.B.* — collection and delivery of biological material samples; *Nourdin I.* — collection and delivery of biological material samples, conducting research; *Tokarevich N.K.* — literature data analysis; *Bumbaly S.* — organization, collection and delivery of biological material samples; *Sidime Yu.* — organization, collection and delivery of biological material samples; *Shcherbakova S.A.* — research management; *Kutyrev V.V.* — general management. All authors confirm that their authorship meets the ICMJE criteria, made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 24.06.2024;
accepted for publication 08.08.2024;
published 30.10.2024



Усиление системного и локализованного в лёгких CD4⁺-Т-клеточного иммунного ответа при укорочении белка NS1 штамма сезонной живой гриппозной вакцины

Прокопенко П.И.[✉], Степанова Е.А., Матюшенко В.А., Рак А.Я., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С., Кудрявцев И.В., Рубинштейн А.А., Комлев А.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. В мире существует большое разнообразие лицензированных вакцин против гриппа, но их общими недостатками являются достаточно узкая специфичность и неспособность защищать от дрейфовых вариантов вируса. Соответственно, оптимизация иммуногенных и кросс-протективных свойств лицензированных гриппозных вакцин — актуальная задача практического здравоохранения. Одним из таких подходов является модуляция иммуногенных свойств живой гриппозной вакцины (ЖГВ) за счёт усечения рамки считывания неструктурного белка 1 вируса гриппа (NS1). Основной целью данной работы является оценка иммуногенных свойств сезонной ЖГВ подтипа H1N1 при усечении рамки считывания белка NS1 до 126 аминокислот.

Материалы и методы. Методами обратной генетики сконструированы 2 штамма ЖГВ подтипа H1N1 с полноразмерным и с усечённым белком NS1, где после 126 аминокислот добавлены 3 последовательных стоп-кодона. Мышей линии C57Bl/6J иммунизировали интраназально двукратно с 3-недельным интервалом. Через 7 дней после повторной иммунизации у мышей выделяли клетки из тканей селезёнки и лёгких, стимулировали цельным диким вирусом H1N1 и оценивали уровни системных и тканерезидентных цитокинпродуцирующих CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти методом внутриклеточного окрашивания цитокинов. Также была проведена оценка репродукции штаммов в системах *in vitro* и *in vivo*.

Результаты. Укорочение белка NS1 в ЖГВ значительно повышало уровни вирусспецифических CD4⁺-Т-клеток эффекторной памяти в селезёнке и уровни тканерезидентных CD4⁺-Т-клеток в лёгких мышей после двукратной иммунизации, что указывает на более высокий потенциал защиты от гриппозной инфекции у ЖГВ с усечённым белком NS1 по сравнению с классическим вариантом ЖГВ. Важно отметить, что ЖГВ с усечённым белком NS1 также имела более выраженный аттенуированный фенотип в эксперименте на мышах, чем её классический аналог.

Ключевые слова: вирус гриппа, живая гриппозная вакцина, белок NS1, Т-клетки памяти, Т-клетки эффекторной памяти, тканерезидентные Т-клетки, CD4⁺-Т-клетки, CD8⁺-Т-клетки

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 Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки России FGWG-2022-0001.

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

Для цитирования: Прокопенко П.И., Степанова Е.А., Матюшенко В.А., Рак А.Я., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С., Кудрявцев И.В., Рубинштейн А.А., Комлев А.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Усиление системного и локализованного в лёгких CD4⁺-Т-клеточного иммунного ответа при укорочении белка NS1 штамма сезонной живой гриппозной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):619–627.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-582>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-582>

Enhancement of systemic and lung-localized CD4⁺ T-cell immune responses by truncation of NS1 protein of a seasonal live influenza vaccine strain

Polina I. Prokopenko[✉], Ekaterina A. Stepanova, Victoria A. Matyushenko, Alexandra Ya. Rak, Anna K. Chistjakova, Arina D. Kostromitina, Tatyana S. Kotomina, Igor V. Kudryavtsev, Artem A. Rubinstein, Alexey S. Komlev, Larisa G. Rudenko, Irina N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. There is a large variety of licensed influenza vaccines worldwide, but their common limitation is rather narrow specificity and inability to protect against antigenic-drift variants of influenza virus. Therefore, optimization of immunogenic and cross-protective properties of licensed influenza vaccines is an urgent priority of public health agenda. One such approach is to modulate the immunogenic properties of live attenuated influenza vaccine (LAIV) by truncating the open reading frame of influenza virus non-structural protein 1 (NS1). The **main objective** of this study is to evaluate the immunogenic properties of the H1N1 seasonal LAIV strain by truncation of the NS1 protein to 126 amino acids.

Materials and methods. Using reverse genetics technique, two H1N1 LAIV strains with full-length and truncated NS1 protein with three consecutive stop codons added after the 126th amino acid residue were obtained. C57BL/6J mice were immunized intranasally with the vaccine candidates, twice at a three-week interval. Seven days after the second immunization, cells were isolated from spleen and lung tissues and stimulated with whole wild-type H1N1 influenza virus. Levels of systemic and tissue-resident cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells were assessed by intracellular cytokine staining assay with flow cytometry. Replication of engineered vaccine strains in *in vitro* and *in vivo* systems was also evaluated.

Results. Truncation of NS1 protein of the LAIV strain significantly increased the levels of virus-specific CD4⁺ effector memory T cells in spleens and the levels of CD4⁺ tissue-resident memory T cells in lungs of mice after two-dose immunization, indicating a higher potential for protection against influenza infection of the LAIV NS₁₂₆ vaccine strain compared to the classical variant of LAIV. Importantly, the LAIV NS₁₂₆ strain also had a more pronounced attenuated phenotype in mice than its classical counterpart.

Keywords: influenza virus, live attenuated influenza vaccine, NS1 protein, memory T cells, tissue-resident memory T cells, tissue-resident memory T cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells

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 Institute of Experimental Medicine (protocol No. 1/20, February 27, 2020).

Funding source. The work was carried out within the framework of the Ministry of Education and Science project FGWG-2022-0001.

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

For citation: Prokopenko P.I., Stepanova E.A., Matyushenko V.A., Rak A.Ya., Chistjakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S., Kudryavtsev I.V., Rubinstein A.A., Komlev A.S., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Enhancement of systemic and lung-localized CD4⁺ T-cell immune responses by truncation of NS1 protein of a seasonal live influenza vaccine strain. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):619–627.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-582>

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

Введение

Вирусы гриппа представляют собой постоянную угрозу мировому сообществу ввиду их высокой контагиозности и способности вызывать тяжёлые эпидемии, ежегодно уносящие до 650 тыс. человеческих жизней [1]. Наиболее эффективным средством борьбы с гриппозной инфекцией остаётся вакцинация, которая направлена в основном

на предотвращение развития тяжёлых случаев заболевания, а также его осложнений. Существует достаточно большое разнообразие лицензированных вакцин против гриппа, но их эффективность в различные эпидемические сезоны сильно варьируется ввиду узкой специфичности индуцируемого иммунного ответа на вакцинацию [2]. В этой связи поиск новых подходов к повышению иммуноген-

ности и расширению спектра действия сезонных гриппозных вакцин имеет первостепенное значение для мирового здравоохранения.

Неструктурный белок 1 (NS1) вируса гриппа А многофункциональный и участвует в различных стадиях взаимодействия вируса с клеткой: он является антагонистом противовирусного клеточного ответа и регулятором экспрессии вирусных и клеточных генов [3, 4]. В частности, белок NS1 вируса гриппа выполняет функцию антагониста интерферона (ИФН) и тем самым способствует развитию продуктивной инфекции, нарушая одно из важнейших звеньев противовирусного иммунитета [5]. Кроме того, С-концу белка NS1 приписывают функцию снижения активации дендритных клеток и, следовательно, нарушения стимуляции наивных Т-клеток [6]. Соответственно, иммуногенность живой гриппозной вакцины (ЖГВ) может быть усилена за счёт усечения белка NS1 с С-конца с целью ослабления его анти-ИФН-активности. Ранее нами был сконструирован вакцинный штамм ЖГВ подтипа H7N9, который кодировал укороченный до 126 аминокислот белок NS1. Эксперименты на мышах показали, что такая модификация приводила к существенному усилению Т-клеточного ответа к иммунодоминантному эпитопу NP₃₆₆ по сравнению с иммунизацией ЖГВ с полноразмерным NS1 [7].

Целью настоящего исследования явилась оценка модуляции иммуногенных свойств вакцинного штамма сезонной ЖГВ подтипа H1N1 при усечении рамки считывания белка NS1 до 126 аминокислот. При этом изучался системный и локальный Т-клеточный ответ ко всем антигенам вируса гриппа путём стимуляции иммунных клеток цельным живым эпидемическим вирусом гриппа H1N1.

Материалы и методы

Вирусы

Экспериментальные реассортантные штаммы подтипа H1N1 получены стандартными методами обратной генетики на основе донора аттенуации отечественной ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) [8]. В качестве родительского эпидемического вируса гриппа выступал штамм А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1) [H1N1/wt], полученный из коллекции NIBSC (Великобритания). Вакцинный штамм ЖГВ H1N1 с полноразмерным белком NS1 содержал гены *PB2*, *PB1*, *PA*, *NP*, *M* и *NS* от донора аттенуации Лен/17, а гены гемагглютинина и нейраминидазы — от эпидемического вируса H1N1/wt. Для получения рекомбинантного вируса гриппа, экспрессирующего усечённый белок NS1, после 126 аминокислот открытой рамки считывания белка NS1 вируса Лен/17 добавлены 3 последовательных стоп-кодона с помощью сайт-направленного мутагенеза с использова-

нием набора «Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit» («New England Biolabs») и специфических праймеров («Evrogen Ltd.»). Вирусы культивировали в 10–11-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (птицефабрика «Синявинская») при 33°C (для вакцинных штаммов ЖГВ) или при 37°C (для эпидемического штамма H1N1/wt) и хранили при –70°C в аликвотах.

Клеточные линии

Клетки почки собаки MDCK (ATCC CCL-34) и клетки почки зелёной мартишки Vero (ATCC CCL-81) культивировали в ростовой среде DMEM с содержанием 10% эмбриональной бычьей сыворотки и добавлением антибиотика-антимикотика (перечисленные реагенты — «Capricorn»).

Определение инфекционной активности вирусов гриппа

Инфекционные титры вирусов определяли методом предельных разведений. Для заражения РКЭ вирусы разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и каждым разведением заражали 4–6 эмбрионов в объёме 200 мкл. РКЭ инкубировали при 33°C и 38°C в течение 48 ч или при 26°C в течение 6 сут, после чего эмбрионы охлаждали; наличие вируса в аллантоисной жидкости определяли в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. Определение инфекционных титров вирусов на клеточных культурах проводили путём заражения суточной монослойной культуры в формате 96-луночных планшетов серийными 10-кратными разведениями вирусов. После адсорбции инокулят удаляли, клетки промывали, инкубировали в среде DMEM с содержанием 1 мкг/мл трипсина TPCK и антибиотика-антимикотика при 33°C в течение 4 сут. Наличие вирусов в лунках определяли путём окрашивания зафиксированных в ацетоне клеток моноклональным анти-NP-антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (ООО «ППДП»). Проявку осуществляли с помощью субстрата ТМБ («Thermo Fisher Scientific»), и оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре «xMark» («BioRad»). Лунки считали положительными при значениях оптической плотности ($\lambda = 450$ нм), превышающих значения отрицательных контрольных лунок минимум в 2 раза. Титры вирусов в РКЭ и клетках Vero и MDCK рассчитывали по методу L.J. Reed и соавт. [9] и выражали в 50% инфекционных дозах (lg ЭИД₅₀/мл и lg ТЦИД₅₀/мл).

Накопление и очистка вируса гриппа на градиенте сахарозы

Для проведения иммунологических тестов вирус гриппа H1N1/wt очищали на градиенте сахарозы для удаления неспецифических белков куриных эмбрионов и для концентрирования вируса.

Очистку вирусов проводили на 30%/60% градиенте плотности с использованием ультрацентрифуги («BeckmanCoulter») в несколько этапов:

1) осветление собранной аллантоисной жидкости путём центрифугирования в течение 15 мин при 4°C при 3500g;

2) осаждение при 16 000g в течение 2 ч при 4°C и ресуспендирование образованного осадка в 2 мл ФСБ;

3) наслаивание ресуспендированного осадка на 30%/60% ступенчатый градиент сахарозы с последующим ультрацентрифугированием в течение 2 ч и при 4°C при 23 000g;

4) сбор концентрированного вируса на границах градиента и его отмывка в 10 мл ФСБ путём центрифугирования в течение 1,5 ч при 23 000g. На последнем этапе вирусный осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ и хранили при -70°C в аликвотах.

Иммунизация мышей и сбор органов

В работе использовали самок мышей линии C57Bl/6J, поставляемых из питомника «Филиал Столбовая» НЦБМТ ФМБА России. Мышей иммунизировали двукратно интраназально с интервалом в 21 день одним из рекомбинантных штаммов ЖГВ в дозе 10^6 ЭИД₅₀ в объёме 50 мкл с использованием лёгкого эфирного наркоза. Контрольные животные получали равный объём ФСБ. На 3-и сутки у 4 вакцинированных мышей из каждой группы осуществляли забор лёгких и носовых ходов, которые в дальнейшем гомогенизировали с использованием автоматического гомогенизатора «TissueLyser LT» («Qiagen»). Гомогенаты лёгочной и носовой ткани использовали для определения инфекционного титра вируса в системе РКЭ. Через 7 сут после повторной иммунизации у 6 мышей из каждой группы собирали лёгочную ткань и селезёнки для дальнейшей оценки Т-клеточного иммунитета. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

Оценка Т-клеточного иммунного ответа

Определение системных и локализованных в лёгких Т-клеток памяти проводили по ранее описанному методу [7] с небольшими модификациями. Одиночные спленоциты выделяли в среде CR-0 (RPMI-1640 с добавлением антибиотика-антимикотика, 25 мМ HEPES (перечисленные реагенты от «Capricorn») и 50 мкМ 2-меркаптоэтанолом («Sigma-Aldrich»), используя фильтры с размером пор 70 мкм («BD Biosciences»). Затем эритроциты лизировали с помощью буфера для лизиса эритроцитов («BioLegend»). Для внутриклеточного окрашивания цитокинов 2×10^6 клеток добавляли в стерильные микропланшеты с U-образным дном в 100 мкл среды CR-10 (среда CR-0, содержащая

10% эмбриональной бычьей сыворотки). Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл среды CR-10, содержащей очищенный цельный вирус H1N1/wt в дозе 2 инфекционные единицы на клетку, и инкубировали в течение 18 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем к пробам добавляли раствор GolgiPlug («BD Biosciences») в конечной концентрации 1 : 1000 для остановки белкового транспорта. Стимуляцию форболмиристил ацетатом («Sigma-Aldrich») использовали в качестве положительного контроля; также были приготовлены нестимулированные контрольные образцы и образцы изотипического контроля. Клетки инкубировали в течение 5 ч при 37°C, 5% CO₂, затем окрашивали в течение 20 мин при 4°C в темноте с помощью флуоресцентного красителя для выявления живых/мёртвых клеток ZombieAqua и смесью следующих флуоресцентно меченных поверхностных антител: CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-APC/Cy7, CD44-PE, и CD62L-BV421 (перечисленные реагенты — «BioLegend»). Набор «Cytofix/Cytoperm» («BD Biosciences») использовали для фиксации/пермеабиллизации, после чего клетки окрашивали антителами к цитокинам: ИФН-γ — FITC, фактору некроза опухоли-α (ФНО-α) — APC, интерлейкину-2 (ИЛ-2) — PE/Cy7 в течение 20 мин при 4°C в темноте. Образцы фиксировали буфером CytoLast (антитела и буфер — «BioLegend») и анализировали с помощью цитофлуориметра «Navios» («BeckmanCoulter»).

Для обнаружения тканерезидентных Т-клеток памяти (T_{RM}) перфузированные раствором ФСБ лёгкие разрезали на мелкие кусочки стерильными ножницами и обрабатывали смесью ДНКазы I и коллагеназы («Sigma-Aldrich») в течение 40 мин при 37°C. Затем готовили суспензию отдельных клеток с помощью фильтров с размером пор 70 мкм. Эритроциты лизировали, как описано выше, и стимулировали цельным вирусом H1N1/wt с последующим выявлением вирусспецифических Т-клеток эффекторной памяти (T_{EM}; CD44⁺CD62L⁻), экспрессирующих маркеры тканерезидентности (CD69⁺CD103⁺). Набор для окраски поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов включал: CD4 — PerCP/Cy5.5, CD8 — APC/Cy7, CD44 — APC, CD62L — BV421, CD69 — PE/Cy7, CD103 — FITC, в то время как внутриклеточную окраску проводили только на один цитокин — ИФН-γ — PE/Dazzle (перечисленные реагенты — «BioLegend»). Подсчитывали количество цитокин-позитивных клеток в стимулированных группах и вычитали уровень спонтанной секреции цитокинов в нестимулированных контрольных образцах.

Статистическая обработка результатов

Данные проточной цитометрии проанализированы в программе «Kaluza Analysis» («BeckmanCoulter»). Статистический анализ и под-

готовку иллюстраций проводили с помощью программы «GraphPad Prism v. 7.0». Для сравнения данных использовали дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Тьюки или U-критерий Манна–Уитни; различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В настоящем исследовании генно-инженерными методами получен штамм сезонной ЖГВ подтипа H1N1, экспрессирующий усечённый до 126 аминокислот неструктурный белок 1 (ЖГВ H1N1 NS1₁₂₆). В экспериментах *in vitro* было показано, что классический вакцинный штамм ЖГВ H1N1 и модифицированный вариант ЖГВ H1N1 NS1₁₂₆ обладали сходными ростовыми характеристиками в различных системах культивирования, однако вариант с NS1₁₂₆ достоверно более слабо размножался при пониженной до 26°C температуре (таблица). Эти результаты согласуются с полученными ранее данными о фенотипических характеристиках вакцинных штаммов ЖГВ с NS1₁₂₆ [7, 10]. Кроме того, модифицированный штамм практически не размножался в верхних дыхательных путях мышей, в отличие от классического штамма ЖГВ, что также согласуется с полученными ранее данными об усилении аттенуирующих свойств вакцины при укорочении рамки считывания белка NS1.

Двукратная иммунизация мышей ЖГВ и ЖГВ NS1₁₂₆ стимулировала индукцию высоких уровней вирус-специфических T_{EM} с фенотипом CD44⁺CD62L⁻ в селезёнках мышей, причём укорочение белка NS1 в вакцинном штамме ЖГВ значительно повышало уровни полифункциональных CD4⁺T_{EM}-клеток, секретирующих одновременно 2 (ИФН-γ, ФНО-α) или 3 (ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-2) цитокина (рис. 1, а). Кроме того, только в группе мышей, получивших ЖГВ NS1₁₂₆, обнаруживались достоверно более высокие уровни ИФН-γ-продуцирующих цитотоксических T-клеток памяти по сравнению с контролем (рис. 1, б). Таким образом, полученные данные указывают на то, что модифицированный штамм ЖГВ NS1₁₂₆ может обладать более высоким потенциалом защиты от гриппозной инфекции, чем классический вариант ЖГВ.

Далее проведено исследование субпопуляций вирус-специфических T_{EM}-клеток в лёгких с оценкой экспрессии этими клетками поверхностных маркеров T_{RM}-клеток памяти. Оценка уровней ИФН-γ-продуцирующих T_{EM}-клеток в лёгких иммунизированных мышей выявила достоверное усиление CD4⁺-T-клеточного ответа в группе животных, привитых прототипом ЖГВ NS1₁₂₆, по сравнению с классическим вариантом вакцины (рис. 2, а). Для цитотоксических CD8⁺-T_{EM}-клеток в лёгких был показан сопоставимый уровень иммуногенности ЖГВ, не зависящий от модификации белка NS1 (рис. 2, з). При этом уровень экспрессии маркеров тканерезидентности был сопоставим в обеих вакцинных группах (рис. 2, б, в, д, е), что свидетельствует о локализации выявленных вирус-специфических клеток в эпителии лёгких, в непосредственной близости от потенциального места проникновения патогена.

Обсуждение

Существующие противогриппозные вакцины индуцируют преимущественно нейтрализующие антитела, нацеленные на гипервариабельные эпитопы основного антигена вируса гриппа — молекулы гемагглютинина, из-за чего требуется практически ежегодное обновление штаммового состава вакцин. За последнее десятилетие достигнут существенный прогресс в разработке противогриппозных вакцин более широкого защитного спектра, нацеленных на консервативные вирусные антигены, такие как домен стебля гемагглютинина, нейраминидаза или M2e; а также разработаны подходы на основе T-клеток, которые обладают наибольшим потенциалом вызывать долговременные перекрёстные защитные реакции клеток памяти [11]. К настоящему времени накоплен большой массив данных о способности вирусов гриппа, экспрессирующих усечённый белок NS1, стимулировать образование более выраженного адаптивного иммунного ответа, одновременно делая вирус более аттенуированным [12–15]. Однако в подавляющем большинстве исследований использовался модельный лабораторный штамм A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) или штамм, созданный

Репликативные свойства вакцинных штаммов ЖГВ в системах *in vitro* и *in vivo*
Replicative properties of LAIV vaccine strains *in vitro* and *in vivo* systems

Вакцинный штамм Vaccine strain	Титр вируса в РКЭ, lg ЭИД ₅₀ /мл Virus titer in ECE, lg EID ₅₀ /ml			Титр вируса в клетках, lg ТЦИД ₅₀ /мл Virus titer in cells, lg TCID ₅₀ /ml		Титр вируса в органах мышей, lg ЭИД ₅₀ /мл Virus titer in mouse organs, lg EID ₅₀ /ml	
	26°C	33°C	38°C	MDCK	Vero	лёгкие lungs	нос nose
ЖГВ H1N1 LAIV H1N1	5,8 ± 0,4	8,7 ± 0,3	1,9 ± 0,4	7,2 ± 0,3	6,2 ± 0,2	< 1,2	2,3 ± 1,2
ЖГВ H1N1 NS1 ₁₂₆ LAIV H1N1 NS1 ₁₂₆	4,4 ± 0,7	7,6 ± 0,5	< 1,2	5,8 ± 0,8	5,4 ± 0,4	< 1,2	< 1,2

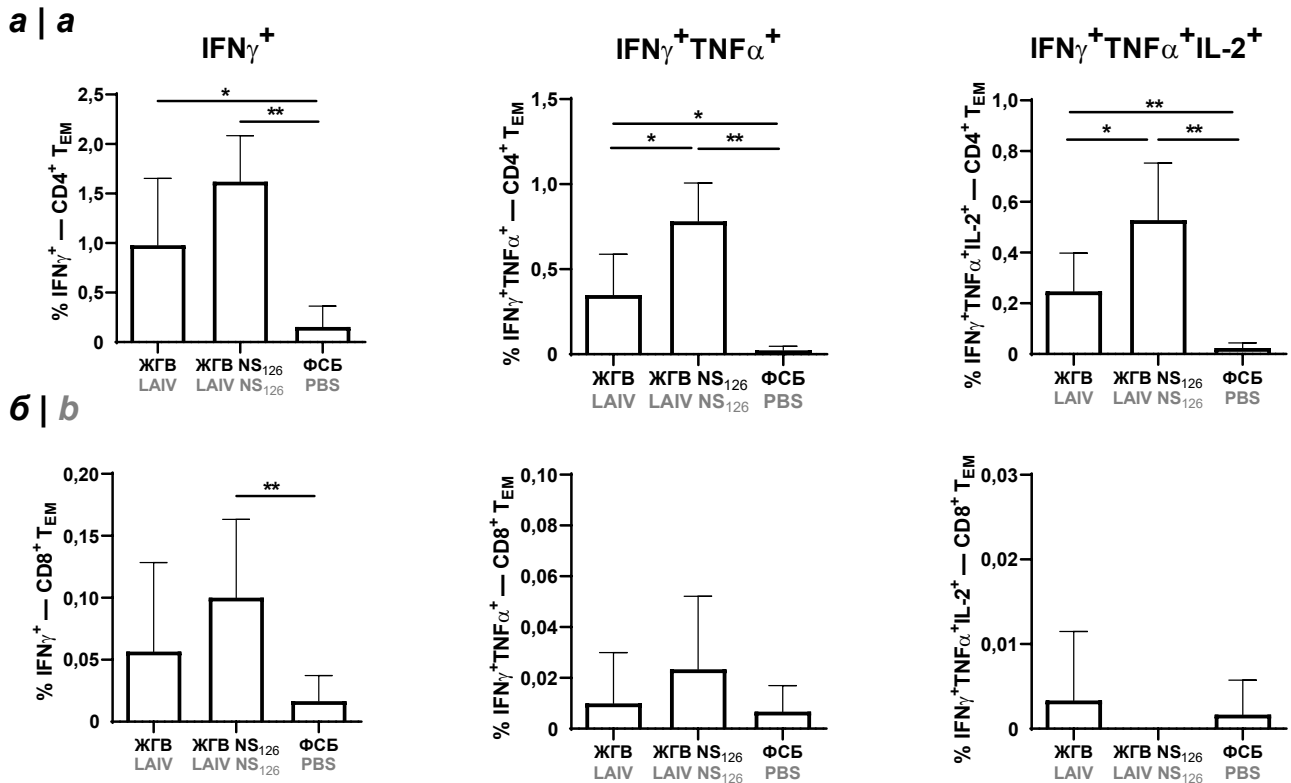


Рис. 1. Количество T_{EM}-клеток (CD44⁺CD62L⁻) с фенотипом CD4⁺ (а) и CD8⁺ (б), экспрессирующих ИФН- γ (I), ИФН- γ и TNF α (II) и ИФН- γ , TNF α и IL-2 (III), в группах мышей, иммунизированных ЖГВ или ЖГВ с укороченным NS1 белком, а также в контрольной группе (ФСБ).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (критерий Манна–Уитни).

Fig. 1. Number of effector memory T cells (CD44⁺CD62L⁻) with CD4⁺ (a) and CD8⁺ (b) phenotype expressing IFN γ (left panel), IFN γ and TNF α (middle panel) and IFN γ , TNF α and IL-2 (right panel) in groups of mice immunized with LAIV or LAIV with truncated NS1 protein, as well as in the control group (PBS).

Significant differences between groups (Mann–Whitney test), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

на основе вируса гриппа дикого типа, что имеет существенный недостаток — вероятность возврата к вирулентному фенотипу в случае возможной реассортации с другими циркулирующими вирусами. В нашем исследовании в качестве основы использован штамм отечественной лицензированной живой гриппозной вакцины, широко применяемой в практике здравоохранения в России и в ряде зарубежных стран [16].

Ранее нами было показано, что усечение до 126 аминокислот белка NS1 вакцинного штамма ЖГВ H7N9 приводит к усилению гуморального и T-клеточного ответа в эксперименте на мышах [7]. В отличие от указанного исследования, где T-клеточный иммунный ответ оценивался путём стимуляции клеток синтетическими пептидами, соответствующими иммунодоминантным CD8⁺-T-клеточным эпитопам NP₃₆₆, в настоящей работе проводили стимуляцию иммунных клеток вакцинированных мышей цельным очищенным вирусом гриппа H1N1/wt. Такая стимуляция лучше отражает реальную клиническую ситуацию, поскольку при гриппе организм сталкивается с циркулирующим вирусом в его естественном виде и инфицированные клетки презентир-

руют на комплексах МНС-I и МНС-II большое разнообразие T-клеточных вирусных эпитопов.

В настоящем исследовании продемонстрировано усиление CD4⁺-T-клеточного ответа у мышей при их иммунизации штаммом живой гриппозной вакцины с модифицированным белком NS1, причём данный эффект был выражен как на системном (спленоциты), так и на локальном уровне (клетки из тканей лёгких). При этом системные вирусспецифические CD4⁺-T-клетки характеризовались полифункциональным фенотипом, продуцируя, помимо ИФН- γ , и другие ключевые провоспалительные цитокины, участвующие в противовирусном ответе, такие как ФНО- α и ИЛ-2. Известно, что T-лимфоциты, способные секретировать одновременно несколько цитокинов в ответ на антигенную стимуляцию, являются более точными предикторами способности организма противостоять реинфекции, чем монофункциональные клетки с секрецией только ИФН- γ [17]. Для системных CD8⁺-T_{EM}-клеток не было выявлено значимого увеличения пропорции цитокинпродуцирующих T-клеток при укорочении белка NS1, вероятно, из-за небольшого количества животных в группе и высокой дисперсии. Эти данные в целом

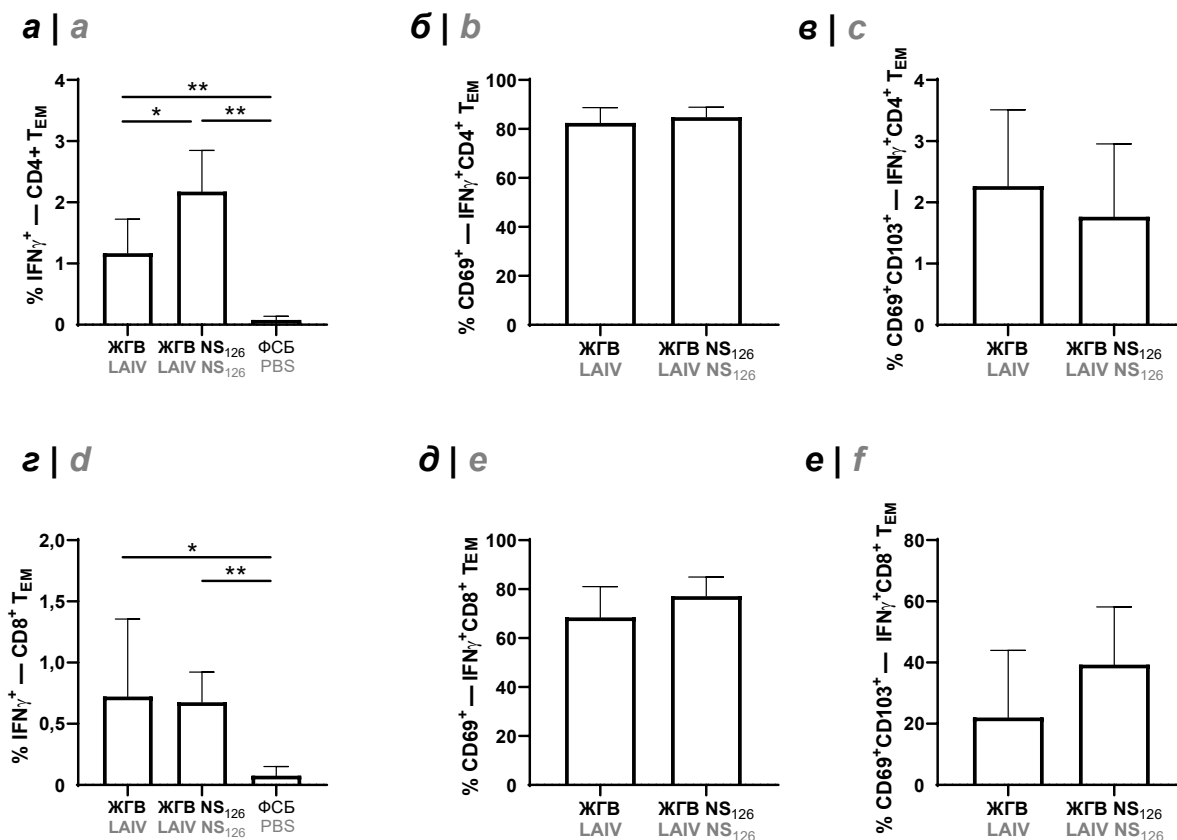


Рис. 2. Индукция вирусспецифических Т-клеток памяти в ткани лёгких при иммунизации мышей исследуемыми вакцинными вирусами.

а, г — количество ИФН- γ -продуцирующих Т_{EM}-клеток (CD44⁺CD62L⁻) с фенотипом CD4⁺ (а) и CD8⁺-клеток (г) в группах мышей, иммунизированных ЖГВ или ЖГВ NS₁₂₆, а также в контрольной группе; б, д — уровень вирусспецифических тканерезидентных клеток памяти с фенотипом CD69⁺CD103⁺ среди ИФН- γ -клеток в популяциях CD4⁺ (б) и CD8⁺-Т-клеток (д); в, е — количество вирусспецифических тканерезидентных клеток памяти с фенотипом CD69⁺CD103⁺ среди ИФН- γ -клеток в популяциях CD4⁺ (в) и CD8⁺-Т-клеток (е). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (критерий Манна–Уитни).

Fig. 2. Induction of virus-specific memory T cells in the lungs after immunization of mice with the study vaccine viruses.

(a, d) Number of IFN γ -producing effector memory T cells (CD44⁺CD62L⁻) with CD4⁺ (a) and CD8⁺ (d) cell phenotype in groups of mice immunized with LAIV or LAIV with truncated NS₁₂₆, as well as in controls. Proportion of virus-specific tissue-resident memory cells with CD69⁺CD103⁺ phenotype among IFN γ ⁺ cells in CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations (b and f, respectively). Proportion of virus-specific tissue-resident memory cells with CD69⁺CD103⁺ phenotype among IFN γ ⁺ cells in CD4⁺ (c) and CD8⁺ T cell populations (e and f, respectively). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ between groups (Mann–Whitney test).

согласуются с полученными ранее результатами для вакцинного штамма H7N9, экспрессирующего укороченный вариант белка NS1, где CD8⁺-Т-клеточный ответ оценивали после стимуляции спленоцитов пептидом, соответствующим иммунодоминантному эпитопу NP₃₆₆ [7]. Важно отметить, что более выраженный Т-клеточный ответ, формирующийся непосредственно в тканях лёгких мышей, иммунизированных вакцинным штаммом ЖГВ с NS1₁₂₆, указывает на потенциал развития ускоренного иммунного ответа при последующем контакте с патогеном, поскольку Т_{RM}-клетки в лёгких представляют собой первую линию иммунной защиты организма от респираторных патогенов [18, 19].

Закключение

В настоящей работе приведены свидетельства усиления системного и локализованного в лёгких

CD4⁺-Т-клеточного иммунного ответа при укорочении белка NS1 штамма сезонной ЖГВ. Поскольку вирусспецифические Т-клетки выявлялись при стимуляции лимфоцитов цельным живым вирусом H1N1/wt, можно предположить, что при повторном инфицировании современным циркулирующим вирусом данного подтипа иммунизированные вариантом ЖГВ H1N1 NS1₁₂₆ мыши будут лучше защищены от клинических проявлений заболевания, чем животные, получившие классический вариант ЖГВ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018;391(10127):1285–300. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33293-2)
2. Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic re-

- view and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012;12(1):36–44. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70295-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70295-x)
3. Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., et al. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* 2014;185:53–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>
 4. Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *J. Gen. Virol.* 2014;95(Pt. 12):2594–611. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.069542-0>
 5. García-Sastre A., Egorov A., Matassov D., et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology.* 1998;252(2):324–30. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9508>
 6. Haye K., Burmakina S., Moran T., et al. The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J. Virol.* 2009;83(13):6849–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02323-08>
 7. Prokopenko P., Matyushenko V., Rak A., et al. Truncation of NS1 protein enhances T cell-mediated cross-protection of a live attenuated influenza vaccine virus expressing wild-type nucleoprotein. *Vaccines (Basel).* 2023;11(3):501. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11030501>
 8. Rekestin A., Isakova-Sivak I., Petukhova G., et al. Immunogenicity and cross protection in mice afforded by pandemic H1N1 live attenuated influenza vaccine containing wild-type nucleoprotein. *Biomed. Res. Int.* 2017;2017(1):9359276. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9359276>
 9. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27:493–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
 10. Kotomina T., Isakova-Sivak I., Matyushenko V., et al. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease. *Antiviral. Res.* 2019;168:9–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.001>
 11. Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenkaya D., et al. Influenza vaccine: progress in a vaccine that elicits a broad immune response. *Expert. Rev. Vaccines.* 2021;20(9):1097–112. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1964961>
 12. Pica N., Langlois R.A., Krammer F., et al. NS1-truncated live attenuated virus vaccine provides robust protection to aged mice from viral challenge. *J. Virol.* 2012;86(19):10293–301. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01131-12>
 13. Baskin C.R., Bielefeldt-Ohmann H., García-Sastre A., et al. Functional genomic and serological analysis of the protective immune response resulting from vaccination of macaques with an NS1-truncated influenza virus. *J. Virol.* 2007;81(21):11817–27. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00590-07>
 14. Vasilyev K.A., Yukhneva M.A., Shurygina A.P.S., et al. Enhancement of the immunogenicity of influenza A virus by the inhibition of immunosuppressive function of NS1 protein. *Microbiology Independent Research Journal.* 2018;(5):48–58. DOI: <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2018-5-1-48-58> EDN: <https://elibrary.ru/ytgzsp>
 15. Vasilyev K., Shurygina A.P., Sergeeva M., et al. Intranasal immunization with the influenza A virus encoding truncated NS1 protein protects mice from heterologous challenge by restraining the inflammatory response in the lungs. *Microorganisms.* 2021;9(4):690. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040690> EDN: <https://elibrary.ru/zfpdqm>
 16. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: process challenges and success stories. *Vaccine.* 2016;34(45):5436–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>
 17. Makedonas G., Betts M.R. Polyfunctional analysis of human T cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer Semin. Immunopathol.* 2006;28(3):209–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-006-0025-4>
 18. Takamura S. Persistence in temporary lung niches: a survival strategy of lung-resident memory CD8+ T cells. *Viral. Immunol.* 2017;30(6):438–50. DOI: <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0016>
 19. Topham D.J., Reilly E.C. Tissue-resident memory CD8+ T cells: from phenotype to function. *Front. Immunol.* 2018;9:515. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00515>

Информация об авторах

Прокопенко Полина Игоревна — м. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, pi.prokopenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7247-979X>

Степанова Екатерина Алексеевна — к. б. н., в. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

Матюшенко Виктория Аркадьевна — н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4698-6085>

Рак Александра Яковлевна — к. б. н., с. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5552-9874>

Чистякова Анна Константиновна — лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9541-5636>

Костромитина Арина Дмитриевна — м. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5432-0171>

Котомина Татьяна Сергеевна — к. б. н., с. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9999-089X>

Information about the authors

Polina I. Prokopenko — junior researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, pi.prokopenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7247-979X>

Ekaterina A. Stepanova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

Victoria A. Matyushenko — researcher, A.A. Smorodintsev Department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4698-6085>

Alexandra Ya. Rak — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5552-9874>

Anna K. Chistyakova — laboratory assistant, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9541-5636>

Arina D. Kostromitina — junior research assistant, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5432-0171>

Tatyana S. Kotomina — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9999-089X>

Igor V. Kudryavtsev — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of cellular immunology, Department of immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

Кудрявцев Игорь Владимирович — к. б. н., зав. лаб. клеточной иммунологии отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

Рубинштейн Артем Аркадьевич — лаборант-исследователь отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8493-5211>

Комлев Алексей Сергеевич — м. н. с. отдела общей патологии и патофизиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9111-0755>

Руденко Лариса Георгиевна — д. м. н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>

Исакова-Сивак Ирина Николаевна — д. б. н, член-корреспондент РАН, зав. лаб. иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>

Участие авторов. *Прокопенко П.И.* — разработка концепции статьи, подготовка и проведение экспериментальных исследований, сбор, обработка и анализ данных, написание текста статьи; *Степанова Е.А.* — разработка концепции статьи, разработка методологических подходов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи; *Матюшенко В.А.* — разработка концепции статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи; *Рак А.Я., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С.* — участие в экспериментах на лабораторных животных, сбор и обработка данных, редактирование текста статьи; *Кудрявцев И.В.* — разработка концепции статьи, разработка методологических подходов, анализ и интерпретация данных; *Рубинштейн А.А.* — разработка методологических подходов, анализ и интерпретация данных, сбор, обработка и анализ данных; *Комлев А.С.* — подготовка материалов для исследования, сбор и обработка данных, редактирование текста статьи; *Руденко Л.Г.* — идея и разработка концепции статьи, написание текста статьи, окончательное утверждение версии для публикации; *Исакова-Сивак И.Н.* — идея и разработка концепции статьи, общее руководство проектом, написание статьи, рецензирование и редактирование текста, окончательное утверждение версии для публикации. 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 01.09.2024;
принята к публикации 16.10.2024;
опубликована 30.10.2024

Artem A. Rubinstein — laboratory assistant, Department of immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8493-5211>

Alexey S. Komlev — junior researcher, Department of general pathology and pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9111-0755>

Larisa G. Rudenko — D. Sci. (Med.), Professor, Head, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>

Irina N. Isakova-Sivak — D. Sci. (Biol.), RAS Corresponding Member, Head, Laboratory of immunology and prevention of viral infections, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>

Author contribution. *Prokopenko P.I.* — development of the concept of the article, preparation and conduct of experimental research, collection, processing and analysis of data, writing the text of the article; *Stepanova E.A.* — development of the concept of the article, development of methodological approaches, analysis and interpretation of data, writing the text of the article; *Matyushenko V.A.* — development of the concept of the article, analysis and interpretation of data, writing the text of the article; *Rak A.Ya., Chistyakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S.* — participation in experiments on laboratory animals, data collection and processing, editing of the text of the article; *Kudryavtsev I.V.* — development of the concept of the article, development of methodological approaches, analysis and interpretation of data; *Rubinstein A.A.* — development of methodological approaches, analysis and interpretation of data, collection, processing and analysis of data; *Komlev A.S.* — preparation of materials for research, data collection and processing, editing of the text of the article; *Rudenko L.G.* — idea and development of the concept articles, writing the text of the article, final approval of the version for publication; *Isakova-Sivak I.N.* — the idea and development of the concept of the article, general project management, writing the article, reviewing and editing the text, final approval of the version for publication. 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 01.09.2024;
accepted for publication 16.10.2024;
published 30.10.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-571>



Циркуляция штаммов *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Central Asian Outbreak в Кемеровской области — Кузбассе в 2018–2022 годах

Жданова С.Н.¹, Вязовая А.А.², Лебедева И.Б.³, Синьков В.В.¹, Кондратов И.Г.¹, Шварц Я.Ш.⁴, Рычкова Л.В.¹, Брусина Е.Б.³, Мокроусов И.В.², Огарков О.Б.¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия;

²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

³Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия;

⁴Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулёза, Новосибирск, Россия

Аннотация

Введение. Кемеровская область — Кузбасс характеризуется распространённостью туберкулёза (ТБ) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), в том числе сочетанного с ВИЧ-инфекцией (ВИЧ/ТБ). Обнаружена высокая частота МЛУ среди штаммов Beijing, в том числе субтипа Central Asian Outbreak (CAO), что актуализирует исследования возбудителя с учётом этого резистентного варианта. **Цель** исследования: изучить молекулярно-генетическую структуру популяции *Mycobacterium tuberculosis*, оценить распространённость и возможные пути появления штаммов Beijing CAO в Кемеровской области — Кузбассе.

Материалы и методы. Изучено 325 штаммов *M. tuberculosis*, выявленных за 2018–2022 гг., методами сплюготиширования, MIRU-VNTR 24 и SNP-тиширования. Для 7 штаммов Beijing CAO проведены полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ.

Результаты. Первичная МЛУ и преширокая лекарственная устойчивость (пре-ШЛУ) обнаружены у 39,4 и 11,5% штаммов соответственно. В общей выборке МЛУ составила 43,4%, пре-ШЛУ — 19,7%. В структуре популяции *M. tuberculosis* преобладал генотип Beijing (78,8%), его субтипы Central Asian Russian (40,9%) и B0/W148 (32,6%). Евро-американская линия (27,3%) представлена генотипами T (6,5%), LAM (5,8%), Ural (4,9%), H (0,9%); обнаружен 1 штамм CAS1-Delhi; 2,8% штаммов не идентифицированы. Доля Beijing CAO составляла 12,6% общей выборки, данный субтип значимо чаще обнаруживали среди ВИЧ/ТБ (20,6%), чем у ВИЧ-негативных больных ТБ (9,1%; $p = 0,005$). Результаты анализа геномов Beijing CAO из Кемеровской области свидетельствуют об отсутствии цепи передачи между этими случаями ТБ. Выдвинута гипотеза о заносе Beijing CAO из Центральной Азии и его эндемичной циркуляции в Кемеровской области.

Заключение. В популяции *M. tuberculosis* выявлен высокий уровень МЛУ и пре-ШЛУ у штаммов Beijing, в особенности субтипов B0/W148 (97,2%) и CAO (87,5%). Штаммы Beijing CAO, выявленные преимущественно у впервые выявленных больных ВИЧ/ТБ, требуют дальнейшего наблюдения и контроля их распространения.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing Central Asian Outbreak, Beijing B0/W148, множественная лекарственная устойчивость, туберкулёз, ВИЧ-инфекция

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Научного центра здоровья семьи и репродукции человека (протокол № 4 от 12.04.2023) и Этическим комитетом Кемеровского государственного медицинского университета (протокол № 255/к от 11.11.2020).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания № 121022500179-0.

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

Для цитирования: Жданова С.Н., Вязовая А.А., Лебедева И.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Шварц Я.Ш., Рычкова Л.В., Брусина Е.Б., Мокроусов И.В., Огарков О.Б. Циркуляция штаммов *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Central Asian Outbreak в Кемеровской области — Кузбассе в 2018–2022 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2024;101(5):628–640.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-571>

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

Circulation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing Central Asian Outbreak genotype in the Kemerovo region — Kuzbass in 2018–2022

Svetlana N. Zhdanova^{1✉}, Anna A. Vyazovaya², Irina B. Lebedeva³, Vyacheslav V. Sinkov¹, Ilya G. Kondratov¹, Yakov Sh. Schwartz⁴, Lyubov V. Rychkova¹, Elena B. Brusina³, Igor V. Mokrousov², Oleg B. Ogarkov¹

¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia;

²St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

³Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia;

⁴Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

Abstract

Introduction. The Kemerovo region — Kuzbass is characterized by a high prevalence of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis (TB), including coinfection with HIV (HIV/TB). A previously unknown in Russia relationship between MDR and the Beijing Central Asian Outbreak (CAO) subtype has been discovered, which updates studies of *Mycobacterium tuberculosis* taking into account this resistant variant.

Objective: to study the molecular genetic structure of the *M. tuberculosis* population, to assess the prevalence and possible routes of emergence of Beijing CAO strains in the Kemerovo region — Kuzbass.

Materials and methods. A total of 325 *M. tuberculosis* strains were studied in 2018–2022 using spoligotyping, MIRU-VNTR 24 and SNP typing. Whole genome sequencing and bioinformatics analysis were performed for seven Beijing CAO strains.

Results. Primary MDR and pre-extensive drug resistance (pre-XDR) were detected in 39.4% and 11.5% of strains, respectively. In the total sample, MDR was 43.4%, pre-XDR — 19.7%. In the structure of the *M. tuberculosis* population, the Beijing genotype prevailed (78.8%), with its subtypes Central Asian Russian (40.9%) and B0/W148 (32.6%). The Euro-American lineage (27.3%) was represented by the genotypes T (6.5%), LAM (5.8%), Ural (4.9%), H (0.9%); one strain CAS1-Delhi was detected, the genotype of 2.8% of strains was not identified. The proportion of Beijing CAO was 12.6% of the total sample; this subtype was significantly more often detected among HIV/TB (20.6%) than in HIV-negative TB patients (9.1%; $p = 0.005$). The results of the Beijing CAO genome analysis from the Kemerovo region indicate the absence of a direct chain of transmission between these TB cases. A hypothesis has been put forward about the introduction of Beijing CAO to the Kemerovo region from Central Asia and its endemic circulation in the region.

Conclusion. A high level of MDR and pre-XDR was detected in Beijing genotype strains in the *M. tuberculosis* population of the Kemerovo region — Kuzbass, especially the B0/W148 (97.2%) and CAO (87.5%) subtypes. Beijing CAO strains, detected mainly in newly diagnosed HIV/TB patients, require further monitoring and control of their spreading.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing Central Asian Outbreak, Beijing B0/W148, multidrug resistance, Tuberculosis, HIV infection

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problem (protocol No. 4, April 12, 2023) and Ethics Committee of the Kemerovo State Medical University (protocol No. 255/k, November 11, 2020).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Zhdanova S.N., Vyazovaya A.A., Lebedeva I.B., Sinkov V.V., Kondratov I.G., Schwartz Ya.Sh., Rychkova L.V., Brusina E.B., Mokrousov I.V., Ogarkov O.B. Circulation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing Central Asian Outbreak genotype in the Kemerovo region — Kuzbass in 2018–2022. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):628–640.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-571>

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

Введение

Кемеровская область — Кузбасс, несмотря на позитивные тенденции к снижению активности эпидемического процесса, сохраняет высокие уровни заболеваемости и распространённости туберкулёза (ТБ). Особенностью территории наблюдения является высокая поражённость населения ВИЧ-инфекцией. В 2021 г. заболеваемость ТБ составила 63,07 на 100 тыс. населения, что более чем в 2 раза больше среднероссийского уровня (31,1 на 100 тыс.), распространённость — 138,0 на 100 тыс. населения [1]. В этот же период поражённость ВИЧ (1274,03 на 100 тыс. населения) в 1,62 раза превышала среднероссийский показатель (782,0)¹.

ВИЧ-инфекция не только значительно увеличивает риск развития ТБ, но и вносит вклад в низкую эффективность его лечения². Одной из причин высокой активности эпидемического процесса ТБ является широкое распространение лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.

На этом фоне изучение особенностей современных штаммов *M. tuberculosis*, безусловно, актуально. Ранее в Кемеровской области проведён ряд молекулярно-генетических исследований *M. tuberculosis* и выявлены значимые связи множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) с отдельными штаммами генотипа Beijing [2–4]. Однако распространённость штаммов Beijing субтипа Central Asian Outbreak (CAO), характеризующихся часто МЛУ [5], не оценивалась, хотя они присутствовали в коллекциях других Западно-Сибирских регионов [3, 6].

Цель исследования: изучить молекулярно-генетическую структуру популяции *M. tuberculosis*, оценить распространённость и возможные пути появления штаммов Beijing CAO в Кемеровской области — Кузбассе.

Материалы и методы

Клинические изоляты и тестирование на лекарственную чувствительность

Исследовано 325 клинических изолятов *M. tuberculosis* от больных ТБ из Кемеровской области — Кузбасса: из 2 сплошных скрининговых исследований в 2020–2021 гг. ($n = 86$) и 2022 г. ($n = 163$); из криоколлекции 2018–2019 гг. ($n = 76$) Новосибирского НИИ туберкулёза, являющегося референс-центром по контролю ТБ в Сибири и на Дальнем Востоке России (рис. 1).

Бактериальные изоляты были охарактеризованы стандартными бактериологическими и биохимическими методами и затем подвергнуты тестированию на чувствительность к противотуберкулёзным препаратам (ПТП). Определение лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* проводили методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна–Йенсена (и/или модифицированным методом пропорций на жидкой питательной среде Мидделбрука 7Н9 с применением бактериологического анализатора «Bactec MGIT 960» [3, 4].

Применена терминология лекарственной устойчивости согласно Клиническим рекомендациям «Туберкулёз у взрослых, 2022»:

- монорезистентность — это устойчивость *M. tuberculosis* только к одному ПТП;
- полирезистентность — это устойчивость *M. tuberculosis* к 2 и более ПТП, кроме одновременной устойчивости к изониазиду и рифампицину;
- МЛУ — это устойчивость *M. tuberculosis* одновременно к изониазиду и рифампицину независимо от наличия устойчивости к другим ПТП;
- пре-широкая лекарственная устойчивость (пре-ШЛУ) — это устойчивость *M. tuberculosis* к рифампицину с устойчивостью к изониазиду или без неё, в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону.

Генотипическая идентификация

ДНК экстрагировали описанными ранее методами [3]. Изоляты сначала были дифференцированы на Beijing- и non-Beijing-генотипы [3]. Штаммы Beijing были разделены на две основные группы, которые, как известно, преобладают в России (субтипы B0/W148 и Central Asian Russian), путём тестирования специфических маркеров SNP [3, 4]. Штаммы Beijing Central Asian Russian генотипированы на маркеры CAO [6] разработанным авторами ранее тестом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на специфический SNP в *pks 8* гене (pos.1884305) [7]. Все non-Beijing-штаммы были подвергнуты сполитипированию [3]. Типирование MIRU-VNTR осуществляли по 24 локусам [4].

Полногеномное секвенирование, биоинформатический и статистический анализ

Геномные библиотеки были приготовлены при помощи набора «DNA Flex» («Illumina»). Полногеномное секвенирование (WGS) образцов осуществляли на секвенаторе «NextSeq 550» («Illumina») с использованием набора реагентов v2.5 и проточной ячейкой (High output) 300 циклов. Геномы 330, 59Kem, 145O, 155c были депонированы в NCBI

¹ ВИЧ-инфекция за 2021 г. Бюллетень № 47. URL: <http://www.hivruussia.info/wp-content/uploads/2023/05/Byulleten-47-VICH-infektsiya-za-2021-g.pdf> (дата обращения: 20.03.2024).

² World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2022. URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363752/9789240061729-eng.pdf?sequence=1> (дата обращения: 20.03.2024).

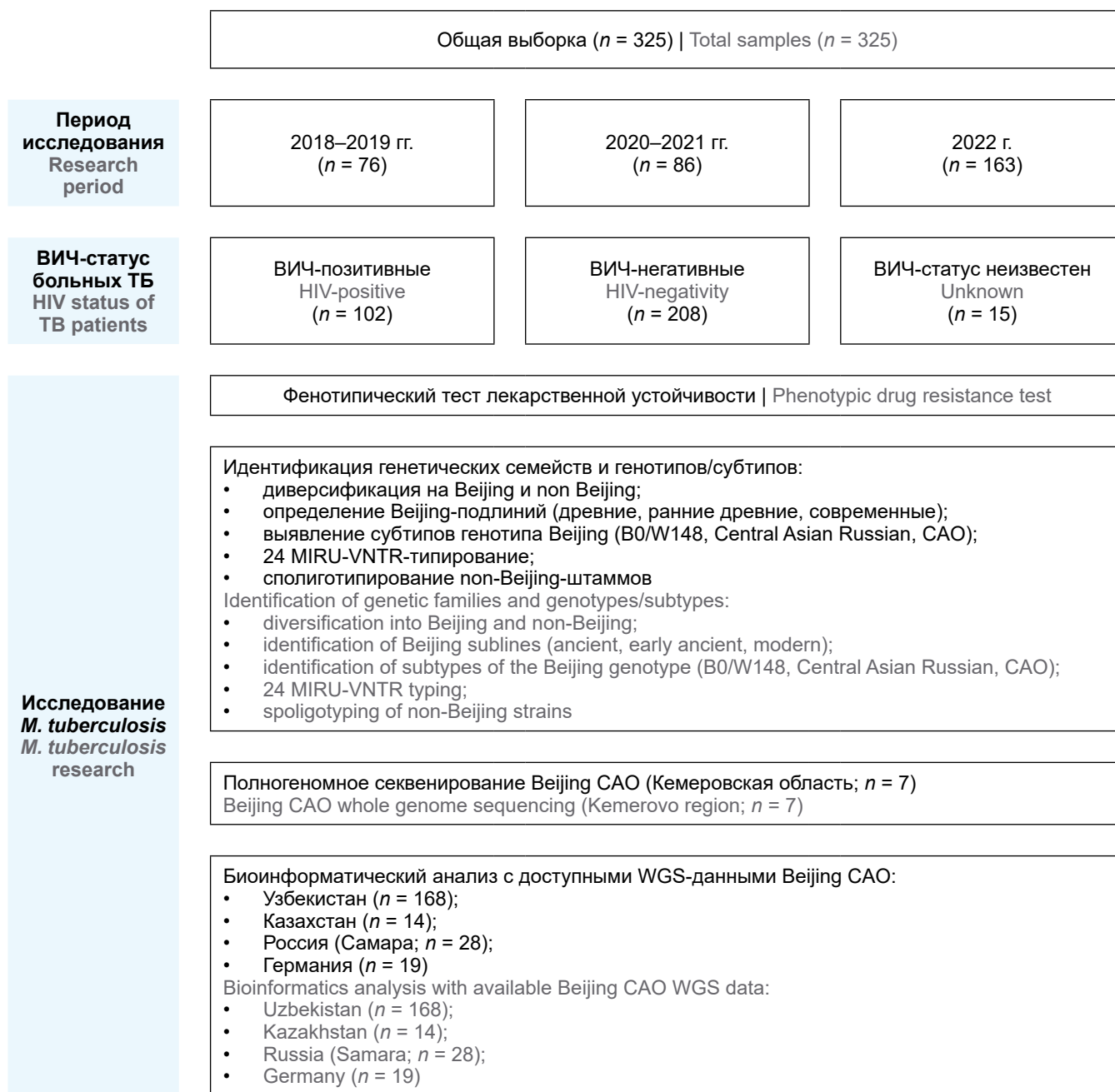


Рис. 1. Схема исследования.

Fig. 1. Study design.

(биопроект PRJNA1139960). Из онлайн-сервиса хранения нативных данных результатов WGS Short Read Archive (NCBI) было получено 229 полных генома *M. tuberculosis* Lineage 2 CAO [5], являющихся частью следующих биопроектов: PRJEB2138, PRJEB21922, PRJEB6273, PRJEB7281, PRJEB9680, PRJNA980215. Первичная обработка данных включала удаление коротких прочтений плохого качества ($Q < 20$) и вырезание технических последовательностей с помощью программы «CutAdapt» [8]. Далее короткие прочтения были картированы на референсный геном NC_000962 с определением однонуклео-

тидных позиций [9]. В результате валидации и нормализации данных для филогенетического анализа использовали конкатентную последовательность нуклеотидных последовательностей массива данных геномов длиной 3568 п.н. Из последовательности были исключены гены резистентности к ПТП, их промоторы, а также гены с высокой изменчивостью (*PP*, *PE*, *PPE*). В качестве аутгруппы был использован геном семейства Beijing, относящийся к древнему варианту (Asian Ancestral 1), который был выделен в Омске (биопроект PRJNA489691), а также ближайшие предки Beijing CAO — гено-

Таблица 1. Демографические и клинические данные больных ТБ, *n* (%)**Table 1.** Demographic and clinical data of TB patients, *n* (%)

Характеристика Characteristic	Общая выборка Total <i>n</i> = 325	Впервые выявленные New cases <i>n</i> = 226	Ранее леченные Previously treated <i>n</i> = 99	χ^2 ; <i>p</i>
Пол Gender				
женский female	102 (31,4)	69 (30,5)	33 (33,3)	0,251; <i>p</i> = 0,616
мужской male	223 (68,6)	157 (69,5)	66 (66,7)	
Возраст, лет Age, years				
19–45	241 (74,2)	159 (70,4)	82 (71,1)	5,589; <i>p</i> = 0,018
≥ 46	84 (25,8)	67 (29,6)	17 (28,9)	
ВИЧ-статус* HIV status				
ВИЧ+ HIV-positive	102 (32,9)	84 (38,5)	18 (19,6)	10,54; <i>p</i> = 0,0012
ВИЧ– HIV-negative	208 (67,1)	134 (61,5)	74 (80,4)	
Клинические формы ТБ TB clinical forms				
инфильтративный infiltrative	100 (30,8)	89(39,4)	11 (11,1)	25,827; <i>p</i> = 0,007
диссеминированный disseminated	101 (31,1)	82 (36,3)	19 (19,2)	
фиброзно-кавернозный fibrous-cavernous	67 (20,6)	20 (8,8)	47 (47,5)	62,759; <i>p</i> < 0,001
очаговый focal	5 (1,6)	5 (2,2)	0	
туберкулёмы tuberculomas	34 (10,5)	19 (8,4)	15 (15,2)	3,343; <i>p</i> = 0,068
казеозная пневмония caseous pneumonia	11 (3,4)	5 (2,7)	6 (5,1)	
внутригрудных лимфатических узлов intrathoracic	3 (1,0)	3 (1,3)	0	0,272; <i>p</i> = 0,602
ТБ-менингит TB meningitis	1 (0,3)	1 (0,4)	0	
ТБ-плеврит TB pleurisy	1 (0,3)	1 (0,4)	0	0,439; <i>p</i> = 0,602

Примечание. *ВИЧ-статус для 15 пациентов не указан, абсолютные данные и расчёт % приведены для 310 пациентов (218 впервые выявленных и 92 ранее леченных).

Note. *HIV status of 15 patients was not indicated; absolute data and percentage calculations are given for 310 patients (218 newly diagnosed and 92 previously treated).

мы Beijing Central Asian (биопроект PRJEB9680). Филогенетическое дерево построено при помощи программы «IQ-TREE2» методом максимального правдоподобия; визуализацию филогенетического дерева осуществляли при помощи программы «FigTree» [9]. Надёжность топологии дерева оценивали на основе бутстреп-анализа с 1000 итераций. В качестве модели замены нуклеотидов была выбрана Transversion Substitution Model, поскольку она имела наилучшие Akaike-значения, вычисленные при помощи IQ-TREE Model Finder. Скорость эволюции и топология деревьев были проанализированы с помощью модели замены общего времени восстановления с гамма-распределённой скоростью замены на каждом сайте и 4 категориями скорости.

Статистический анализ проводили с использованием ресурса MedCalc³, вычисляя значения точного критерия Фишера и отношения шансов. Различия между группами выявляли по критерию χ^2 , значимость подтверждали при *p* < 0,05.

Результаты

Общая характеристика и лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*

В выборке 325 клинических изолятов преобладали образцы от больных с инфильтративной (30,8%), диссеминированной (31,1%) и фиброзно-кавернозной формами ТБ лёгких (20,6%), за ними следовали туберкулёмы (10,5%). Диссеминированный ТБ у ВИЧ-инфицированных встречался значительно чаще (48,0%; 49/102), чем у ВИЧ-отрицательных больных (22,6%; 47/208; *p* < 0,0001), фиброзно-кавернозный ТБ и туберкулёмы, наоборот, имели более высокие показатели у ВИЧ-негативных, тем самым отражая характерные для коинфекции клинические проявления ТБ. От больных с новыми случаями ТБ было получено 226 (69,5%) изолятов (табл. 1). В группе ВИЧ-инфицированных больных новые случаи ТБ составляли значимо большую часть (84,4%; 84/102), чем в группе ВИЧ-негативных (64,4%; 134/208; *p* = 0,002).

Результаты теста на лекарственную чувствительность выявили высокую распространённость клинических изолятов *M. tuberculosis* с лекарствен-

³MedCalc. URL: http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php

Таблица 2. Лекарственная устойчивость изолятов *M. tuberculosis*, *n* (%)

Table 2. Drug resistance of *M. tuberculosis* isolates, *n* (%)

Генотипы, субтипы Genotypes, subtypes	Общая выборка Total <i>n</i> = 325	Впервые выявленные New cases			Ранее леченные Previously treated		
		все all <i>n</i> = 226	ТБ TB <i>n</i> = 134	ВИЧ/ТБ HIV/TB <i>n</i> = 84	все all <i>n</i> = 99	ТБ TB <i>n</i> = 74	ВИЧ/ТБ HIV/TB <i>n</i> = 18
Чувствительные Susceptible	79 (24,3)	74 (32,7)	45 (33,6)	27 (32,1)	5 (5,1)	3 (4,1)	1 (5,6)
Монорезистентные Monoresistant	17 (5,2)	16 (7,1)	10 (7,5)	5 (6,0)	1 (1,0)	0	1 (5,6)
Полирезистентные Polyresistant	24 (7,4)	21 (9,3)	12 (9,0)	9 (10,7)	3 (3,0)	3 (4,1)	0
МЛУ без ШЛУ MDR not XDR	141 (43,4)	89 (39,4)	50 (37,3)	35 (41,7)	52 (52,5)	35 (47,3)	11 (61,1)
пре-ШЛУ pre-XDR	64 (19,7)	26 (11,5)	17 (12,7)	8 (9,5)	38 (38,4)	33 (44,6)	5 (27,8)

ной устойчивостью (75,7%; 246/325) к ПТП (табл. 2). Устойчивость к основным антибиотикам 1-го ряда — рифампицину и изониазиду имели 63,1% (205/325) изолятов. Среди них 19,7% (64/325) случаев сопровождалась также устойчивостью к фторхинолонам, что определяло их как штаммы пре-ШЛУ, их количество ожидаемо было выше среди ранее леченных больных ТБ, чем среди новых случаев (44,6% против 11,5%; $p < 0,001$). Доля штаммов с МЛУ (не пре-ШЛУ) среди впервые выявленных составила 39,4%, а в общей выборке — 43,4%. Уровни МЛУ + пре-ШЛУ не имели значимых отличий у ВИЧ-негативных больных (62,0%; 129/208) от ВИЧ/ТБ (57,8%; 59/102; $p = 0,480$).

Выявлены 5 изолятов с лекарственной устойчивостью к бедаквилину, 4 из которых характеризовались моно- и полирезистентностью и 1 — МЛУ. Оценка лекарственной чувствительности к линезолиду проведена для 163 изолятов из выборки 2022 г.,

когда этот тест был включён в рутинные бактериологические исследования в Кемеровской области; все изоляты сохранили чувствительность к линезолиду. Доля изолятов с пре-ШЛУ была значительно меньше у больных с коинфекцией ВИЧ/ТБ (12,7%; 13/102), чем у ВИЧ-негативных (24,0%; 50/208; $p = 0,022$), т. к. в последней группе было значительно больше ранее леченных случаев ТБ.

Генотипическая структура *M. tuberculosis*

Генотип Beijing выявлен у 256 (78,8%) из 325 изолятов *M. tuberculosis*. Два изолята были отнесены к ранней древней сублинии (интактный NTF и RD 181 [10]), тогда как другие 254 изолята принадлежали современной сублинии Beijing. Доля штаммов Beijing была значимо больше в группе ранее леченных (90,9%), чем в группе впервые выявленных больных ТБ (73,5%; $p < 0,001$; табл. 3), без значимых различий у ВИЧ-отрицательных больных ТБ и ВИЧ/

Таблица 3. Генотипы и субтипы изолятов *M. tuberculosis*, *n* (%)

Table 3. Genotypes and subtypes of *M. tuberculosis* isolates, *n* (%)

Генотипы, субтипы Genotypes, subtypes	Общая выборка Total <i>n</i> = 325	Впервые выявленные New cases			Ранее леченные Previously treated		
		все all <i>n</i> = 226	ТБ TB <i>n</i> = 134	ВИЧ/ТБ HIV/TB <i>n</i> = 84	все all <i>n</i> = 99	ТБ TB <i>n</i> = 74	ВИЧ/ТБ HIV/TB <i>n</i> = 18
Beijing, общее Beijing total	256 (78,8)	166 (73,5)	99 (73,9)	61 (72,6)	90 (90,9)	68 (91,9)	16 (88,9)
Beijing B0/W148	106 (32,9)	61 (27,0)	38 (28,4)	19 (22,6)	45 (45,5)	35 (47,3)	7 (38,9)
Beijing Central Asian Russian без CAO Beijing Central Asian Russian non-CAO	94 (28,9)	68 (30,1)	46 (34,3)	20 (23,8)	26 (26,3)	19 (25,7)	5 (27,8)
Beijing CAO	40 (12,6)	27 (11,9)	9 (6,7)	18 (21,4)	13 (13,1)	10 (13,5)	3 (16,7)
Beijing другие Beijing other	16 (4,9)	10 (4,4)	6 (4,5)	4 (4,8)	6 (6,1)	4 (5,4)	1 (5,6)
Non-Beijing общее Non-Beijing total	69 (21,2)	60 (26,5)	35 (26,1)	23 (27,4)	9 (9,1)	6 (8,1)	2 (11,2)
T	21 (6,5)	19 (8,4)	14 (10,4)	4 (4,8)	2 (2,0)	1 (1,4)	0
LAM	19 (5,8)	15 (6,6)	6 (4,5)	9 (10,7)	4 (4,0)	3 (4,1)	1 (5,6)
Ural	16 (4,9)	15 (6,6)	9 (6,7)	6 (7,1)	1 (1,0)	0	1 (5,6)
H	3 (0,9)	3 (1,3)	0	2 (2,4)	0	0	0
Unknown	9 (2,8)	7 (3,1)	6 (4,5)	1 (1,2)	2 (2,0)	2 (2,7)	0
CAS1-Delhi	1 (0,3)	1 (0,4)	0	1 (1,2)	0	0	0

ТБ (80,3%; против 75,5%; $p = 0,940$). Наиболее многочисленными генетическими группами Beijing были B0/W148 (32,9%) и Central Asian Russian, включая субтип CAO (41,5%; 134/325). Доля субтипа CAO составила 12,6% в общей выборке (15,6% от Beijing) и существенно не различалась у впервые выявленных (11,9%) и ранее леченных (13,1%) больных ТБ. Однако среди новых случаев штаммы CAO обнаруживали чаще в группе ВИЧ/ТБ (21,4%), чем у ВИЧ-негативных (6,7%; $p = 0,005$). В целом доля штаммов Beijing CAO была больше в группе ВИЧ/ТБ (20,6%; 21/102), чем у ВИЧ-негативных (9,1%; 19/208; $p = 0,005$).

Эпидемический субтип B0/W148 Beijing выявлялся чаще среди ранее леченных больных ТБ, чем в новых случаях (45,5% против 27,0% соответственно; $p = 0,001$). При анализе связи по ВИЧ-статусу, истории лечения больных ТБ с другими субтипами Beijing статистически значимых различий между группами штаммов не выявлено.

Все штаммы Beijing CAO из Кемеровской области имели общий профиль MIRU-VNTR 94-32. Информация для оценки связи между случаями была недостаточной, однако анализ доступных данных о 27 из 40 случаев Beijing CAO свидетельствует об отсутствии связей между этими больными по месту проживания. Только 8 случаев ТБ с Beijing CAO были среди жителей разных округов Кемерово, остальные заболевания были выявлены в 10 промышленных городах Кузбасса, отдалённых от областного центра на 27–90 км.

Non-Beijing-изоляты принадлежали к сполитогипам Lineage 4 (Евро-американская линия) и

Lineage 3 (CAS1-Delhi). В ходе сполитогипирования 69 non-Beijing-изолятов был выявлен 31 сполитогип. Помимо одного изолята Lineage 3, остальные представляли 4 генетических семейства Lineage 4: LAM, T, Ural и H (60 изолятов) и 9 неклассифицированных штаммов. Изоляты, принадлежащие к Евро-американской линии, определены по 23 сполитогипам; из них 7 были представлены кластерами, включающими от 2 до 10 изолятов: SIT53/T — 10 изолятов; SIT42 и SIT254/LAM — по 8 изолятов; SIT35/Ural — 7 изолятов SIT262/Ural — 6 изолятов; SIT1480/Ural и SIT2128/T — по 2 изолята.

Лекарственная устойчивость и генотипы

Доля лекарственно-устойчивых к рифампицину и изониазиду штаммов генотипа Beijing составила 74,6% (191/256), что было значительно выше, чем среди non-Beijing — 17,4% (12/69; $p < 0,001$). Частота обнаружения МЛУ + пре-ШЛУ у штаммов генотипа Beijing среди ранее леченных случаев (82,8%; 82/99) была более выражена, чем среди новых случаев ТБ (48,2%; 109/226; $p < 0,001$). Из-за малочисленности штаммов других генетических семейств (non-Beijing) не удалось выявить существенных отличий в частоте МЛУ. Некластеризованные по сполитогипофилю штаммы non-Beijing обладали МЛУ в 26,9% (7/26) случаев, объединённые одним сполитогипом — в 11,6% (5/43; $p = 0,194$).

Наиболее высокие частоты МЛУ + пре-ШЛУ обнаружены у изолятов Beijing субтипов B0/W148 (97,2%; 103/106) и CAO (87,5%; 35/40). Доли МЛУ + пре-ШЛУ-изолятов Central Asian Russian и Beijing

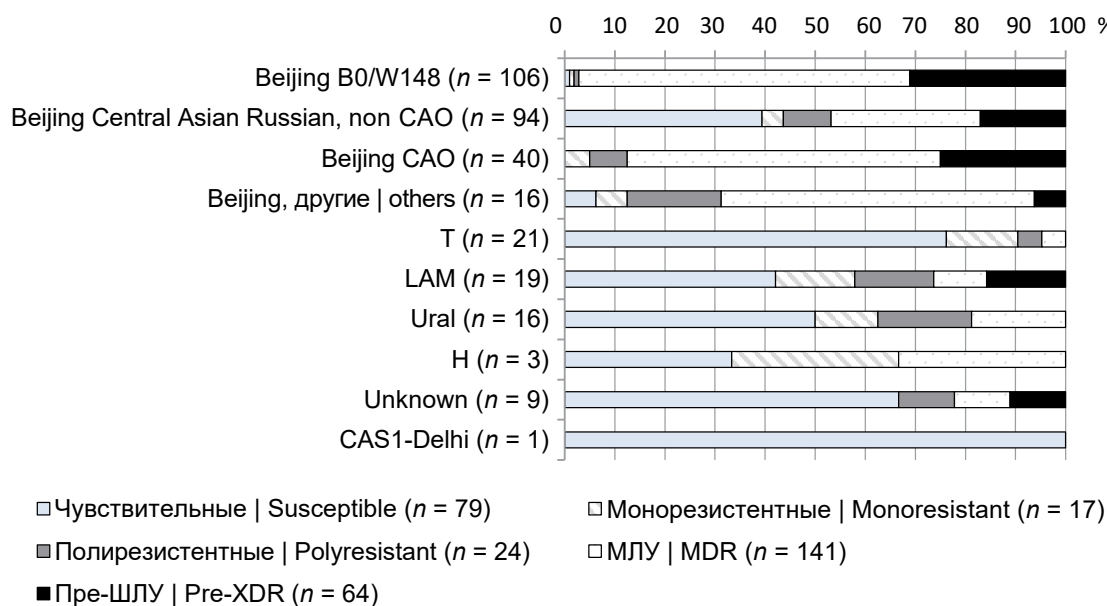


Рис. 2. Лекарственная устойчивость изолятов *M. tuberculosis* в Кемеровской области, %.

Fig. 2. Drug resistance of *M. tuberculosis* isolates in the Kemerovo region, %.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

(другие, включая раннюю древнюю сублинию) составили 46,8% (44/94) и 68,8% (11/16) соответственно (рис. 2).

Биоинформатический анализ показал, что 7 изолятов Beijing CAO, полногеномные данные которых представлены в этом исследовании (kem 59, 330, 155с, 145с, IM117-8с, IM115-6с, IM134-53с), выделенные от 5 ВИЧ-инфицированных и 2 больных ТБ без ВИЧ-инфекции, принадлежали

4 разным кластерам. Примечательно, что один из них был филогенетически близок со штаммами из Узбекистана, что предполагает вероятность происхождения этого штамма за пределами Кемеровской области (рис. 3, отметка 1). Шесть других вошли в 3 отдельные группы на самых «молодых» высоко разрешённых ветвях (бутстреп от 87 до 100%) среди современных штаммов из Казахстана и Европы

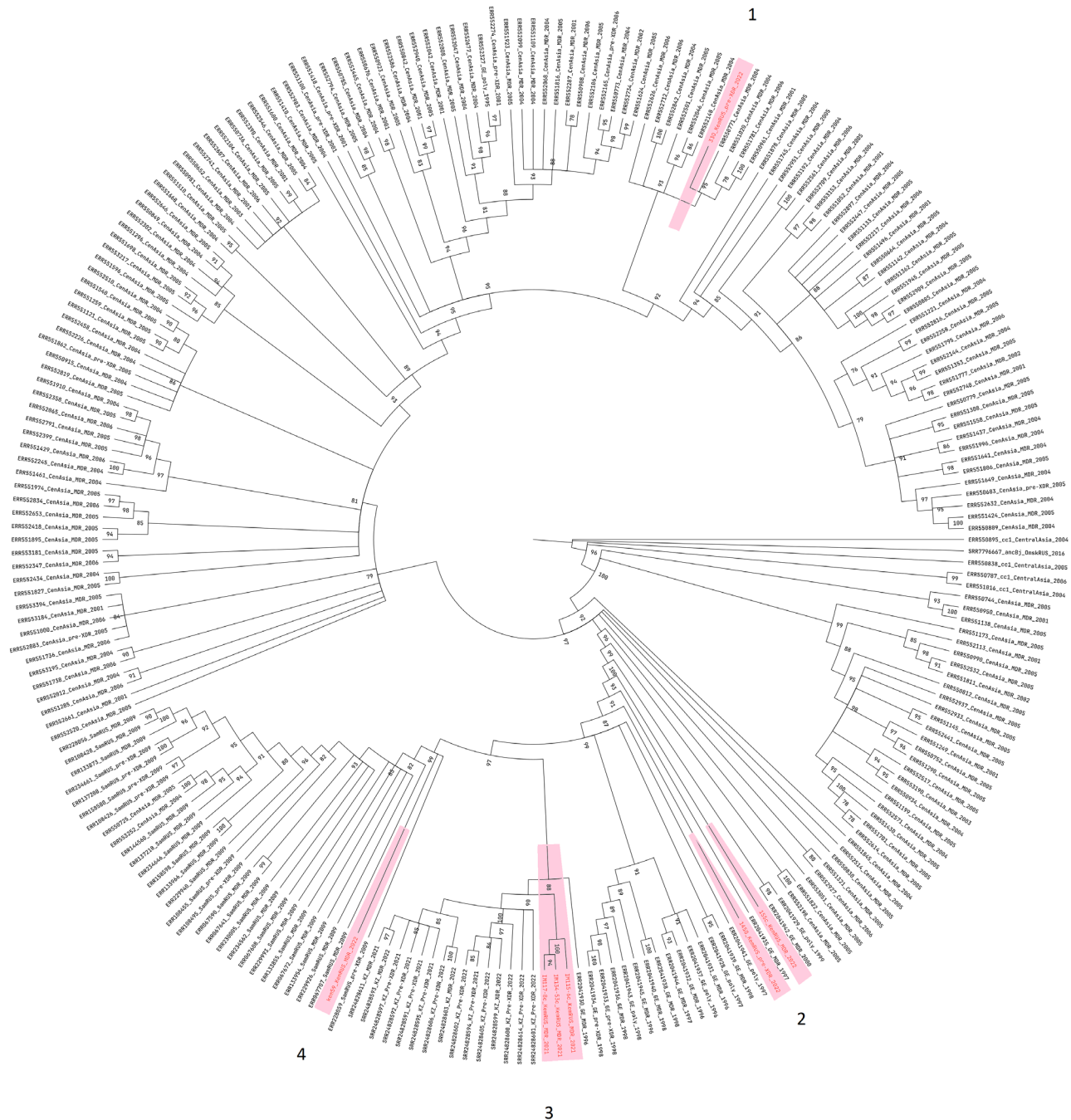


Рис. 3. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия 241 клинического изолята Beijing CAO *M. tuberculosis*. Выделены геномы *M. tuberculosis* от больных ТБ из Кемеровской области (KemRus); номерами 1–4 отмечены их группы; остальные геномы: из Центральной Азии — Узбекистана (CenAsia), Казахстана (KZ), России — Самары (SamRus), Германии (GE).

Fig. 3. Maximum-likelihood phylogenetic tree for sequences of 241 clinical isolates of Beijing CAO *M. tuberculosis*. The genomes from the Kemerovo region are marked; numbers 1–4 mark their groups; sequences from other regions are marked in black with following designations: from Central Asia — Uzbekistan (CenAsia), Kazakhstan (KZ), Samara — Russia (SamRus), Germany (GE).

(Германия). Такое расположение кемеровских образцов на дереве подтверждает отсутствие прямой цепи передачи между этими случаями ТБ (рис. 3, отметки 2–4).

Обсуждение

Исследование современной выборки штаммов *M. tuberculosis* из Кемеровской области показывает, что общая структура генотипов типична для азиатской части России, где доминирующий генотип Beijing (78,8%) представлен в основном двумя субтипами: Central Asian Russian (41,2%) и B0/W148 (32,9%) [11–14]. Однако обнаружено выраженное преобладание Beijing среди ранее леченных случаев ТБ (90,9%), и прежде всего, за счет значимого увеличения доли B0/W148 (с 27,0 до 45,5%). Увеличение доли Beijing B0/W148 прослеживается как среди ВИЧ-негативных больных ТБ, так и ВИЧ-инфицированных. Такое однонаправленное накопление в обеих группах отражает свойства этого эпидемического субтипа, в большинстве случаев несущего первичную МЛУ. Всё это снижает эффективность лечения новых случаев ТБ и, вероятно, уменьшает приверженность терапии МЛУ-ТБ вследствие большей длительности повторных курсов.

Генотип Beijing, который встречался одинаково часто у больных ТБ с разным ВИЧ-статусом, обнаруживал более высокие уровни МЛУ и пре-ШЛУ в

обеих группах: значимой связи МЛУ-ТБ с ВИЧ-инфицированными не выявлено. Таким образом, ранее обнаруживаемое в российских исследованиях [13, 15–17] превышение частоты МЛУ среди ТБ/ВИЧ и их ассоциация с Beijing МЛУ-штаммами не нашла подтверждения в настоящем исследовании.

Основной отличительной особенностью популяции *M. tuberculosis* Кемеровской области стало выявление в структуре Beijing Central Asian Russian около 30% (40/134) штаммов субтипа CAO. По данным нашего исследования, частота МЛУ среди штаммов Beijing Central Asian Russian уступала только Beijing B0/W148 (95,3%): около 60% штаммов были МЛУ + пре-ШЛУ (79 из 134). Этот субтип, объединяющий гетерогенную группу штаммов, в Кемеровской области показал не только исключительно высокое присутствие Beijing CAO (12,9% общей коллекции) по сравнению с другими регионами России (табл. 4), но и крайне высокие уровни МЛУ + пре-ШЛУ (87,5%; 35/40). В свою очередь, исключение образцов, принадлежащих к CAO, из Central Asian Russian группы приводит к снижению доли штаммов с МЛУ до 48,6% (44 из 94), что соответствует среднему показателю для Beijing-генотипа (49,1% МЛУ; 53/108) без учёта B0/W148 в этой группе. Важно, что Beijing CAO значимо чаще выявлялся среди ВИЧ-инфицированных (20,6%). Таким образом, в Кемеровской области — Кузбассе

Таблица 4. Beijing CAO в выборках *M. tuberculosis* из стран Центральной Азии и России, *n* (%)

Table 4. Beijing CAO of *M. tuberculosis* isolates from Central Asian countries and Russia, *n* (%)

Страны (общее количество штаммов) Countries (total number of isolates)	<i>n</i>	Количество изолятов, % от общей выборки Number of isolates, % of total			Источник Source
		Beijing общее Beijing total	Beijing Central Asian Russian	Beijing CAO	
Центральная Азия Central Asia					
Узбекистан Uzbekistan	235	136 (57,9)	58 (24,7)	–	[18]
Узбекистан Uzbekistan	277	237 (85,5)	174 (62,8)	173 (62,5)	[5]
Таджикистан Tajikistan	206	154 (78,4)	49 (23,8)	–	[18]
Кыргызстан Kyrgyzstan	166	121 (72,9)	38 (22,9)	–	[18]
Казахстан Kazakhstan	701	538 (76,7)	314 (51,7)	116 (16,5)	[19]
Казахстан Kazakhstan	29	24 (82,8)	20 (69,0)	15 (51,7)	[20]
Россия Russia					
Коми Komi	130	73 (56,2)	45 (34,6)	2 (1,5)	[10]
Вологда Vologda	82	51 (62,2)	41 (50,0)	7 (8,5)	[16]
Калининград Kaliningrad	73	46 (63,0)	21 (28,8)	4 (5,5)	[10]
Карелия Karelia	67	36 (53,7)	18 (26,9)	3 (4,5)	[10]
Мурманск Murmansk	67	35 (52,2)	23 (34,3)	1 (1,5)	[10]
Псков Pskov	78	45 (57,7)	28 (35,9)	2 (2,6)	[10]
Самара Samara	428	354 (82,7)	214 (50,9)	28 (6,5)	[5]
Омск Omsk	131	93 (71,0)	51 (38,9)	5 (9,8)	[6]

Примечание. Прочерк — нет данных.

Note. Dash indicated the absence of data.

среди штаммов Beijing наиболее успешны не только В0/W148, но и штаммы субтипа CAO. Последние явно получили преимущество от приобретения МЛУ/пре-ШЛУ, выразившееся в широком распространении среди ВИЧ-инфицированных региона.

Трансграничный путь передачи ТБ, вызванного Beijing CAO, из стран Центральной Азии населению Кемеровской области можно рассматривать как наиболее очевидный для появления первых случаев. Описанная М. Merker и соавт. вспышка CAO в Каракалпакии (Узбекистан), оценённая на штаммах 2001–2006 гг. [5], а затем установление динамического накопления с 2015 г. и значительное присутствие Beijing CAO в современных выборках в Казахстане [19–21] свидетельствуют об успешном его распространении за пределами Узбекистана и формировании условий для эндемичной циркуляции. Все обнаруженные в Кемеровской коллекции Beijing CAO входили в суперкластер MIRU-VNTR 94-32 [6], хотя описаны и другие MIRU-VNTR-профили CAO в российских регионах [10, 22], что подчёркивает их текущую в настоящее время эволюцию вследствие происхождения от 94-32 [6].

Наиболее вероятно, что передача Beijing CAO могла быть осуществлена трудовыми мигрантами из Центральной Азии, регулярный приток которых в Кемеровскую область наблюдается в течение последних 30 лет [23]. Несмотря на то что регистрируемая заболеваемость ТБ в Кемеровской области среди приезжающих из Центральной Азии оценивается как низкая (менее 1 случая на 100 тыс. мигрантов) [24], возможность передачи возбудителя ТБ постоянному населению существует. Это согласуется с данными соседней с Кузбассом Новосибирской области, где заболевшие ТБ среди мигрантов — граждане Узбекистана, Таджикистана, Кыргызстана и Казахстана, преобладающие в сезонных потоках в Сибири [25]. На территории Кемеровской области официально регистрируется более 25 тыс. человек, приезжающих ежегодно на заработки. Трудовые мигранты заняты в строительстве, обрабатывающей промышленности, оптовой и розничной торговле, хотя составляют не более 1% численности занятого в экономике населения области [23].

В настоящем исследовании факт выявления штаммов Beijing CAO в 40 случаях ТБ среди постоянного населения Кемеровской области, в частности у 20,6% — ВИЧ/ТБ, позволяет предположить наличие условий эндемичной циркуляции этого варианта *M. tuberculosis* на анализируемой территории.

Кузбасс является высокоурбанизированным промышленным регионом [23] с эпидемическим уровнем распространения ВИЧ-инфекции. Несмотря на тенденции снижения общего числа зарегистрированных ВИЧ-инфицированных лиц с 2016 г., сохраняются высокие уровни обнаружения но-

вых случаев инфекции [26]. В 2021 г. общероссийский уровень заболеваемости составлял 41,7 на 100 тыс. населения, а в Кемеровской области — 83,2⁴. Роль ВИЧ-инфицированных в формировании условий постоянной циркуляции успешных вариантов *M. tuberculosis* на отдельной территории не может быть исключена. В пользу некоторого увеличения контагиозности ВИЧ-инфицированных свидетельствуют риски развития у них бациллярных форм ТБ на фоне недостаточной эффективности химиотерапии МЛУ-ТБ [27]. К тому же, в недавнем исследовании показано, что среди коинфицированных вероятность недавней передачи ТБ-инфекции более чем в 2 раза выше, чем среди общей популяции больных ТБ. При этом эндемичные штаммы имели более высокие шансы быть ответственными за недавнюю передачу среди ВИЧ-положительных пациентов [28]. В выборке настоящего исследования субтип Beijing CAO определялся среди новых случаев значимо чаще у ВИЧ/ТБ (17/84), чем среди ВИЧ-негативных больных ТБ, что может быть также следствием недавнего их заражения.

Филогенетическое моделирование по данным WGS подтверждает, что распространение штаммов CAO в Кемеровской области, наиболее вероятно, является результатом экспансии Beijing-изолятов этого субтипа в Россию из Узбекистана. Ранее М. Merker и соавт. реконструировали историю эволюции штаммов CAO, полученных в 2001–2006 гг. в результате вспышки в Узбекистане, и показали появление первых штаммов в середине 1970-х гг. [5]. Филогеография штаммов CAO показывает, что экспансия из Узбекистана направлена не только в разные регионы России (табл. 4), но и в страны Европы, о чём свидетельствуют представленные в дереве штаммы CAO из Германии и Казахстана (рис. 3), среди которых и кластеризованы 6 изолятов из Кемерово. Наличие 1 кемеровского изолята в кластере CAO из Узбекистана свидетельствует о возможности недавней трансграничной передачи этого субтипа из Центральной Азии в Кемеровскую область.

Таким образом, в Кемеровской области выявлено значительное распространение штаммов не только высокотрансмиссивного субтипа В0/W148 (31,9%), но и редко встречающегося в Сибири субтипа Beijing CAO (12,6%), несущих в большинстве случаев МЛУ и пре-ШЛУ. Представлена гипотеза о появлении Beijing CAO в Кузбассе в результате многократных заносов из Узбекистана напрямую или опосредованно через соседние страны. Явление укоренения Beijing CAO в Кузбассе и возникновение эндемичной циркуляции этих штаммов среди

⁴ ВИЧ-инфекция за 2021 г. Бюллетень № 47. URL: <http://www.hivrusia.info/wp-content/uploads/2023/05/Byulleten-47-VICH-infektsiya-za-2021-g.pdf> (дата обращения: 20.03.2024).

ВИЧ-инфицированных требует дальнейшего изучения с использованием WGS.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Санников А.Л., Заглубоцкая А.С., Пономаренко М.А. и др. Эпидемиологический анализ проблемы туберкулеза в территориях Сибирского федерального округа. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2023;(12). Sannikov A.L., Zaglubotskaya A.S., Ponomarenko M.A. An epidemiological analysis of the tuberculosis problem in the territories of the Siberian Federal District. *International Research Journal*. 2023;(12). DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.128> EDN: <https://elibrary.ru/ppkvwp>
- Dymova M.A., Kinsht V.N., Cherednichenko A.G., et al. Highest prevalence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation. *J. Med. Microbiol.* 2011;60(Pt. 7):1003–9. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.027995-0>
- Vyazovaya A., Felker I., Schwartz Y., Mokrousov I. Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* from referral clinics in Western Siberia, Russia: before and during the COVID-19 pandemic. *Infect. Genet. Evol.* 2022;103:105343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022>
- Лебедева И.Б., Жданова С.Н., Кондратов И.Г. и др. Генетическая структура и лекарственная устойчивость популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Кемеровской области – Кузбассе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):428–41. Lebedeva I.B., Zhdanova S.N., Kondratov I.G., et al. Genetic structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Kemerovo Region – Kuzbass. *Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*. 2023;100(6):428–41. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-449> EDN: <https://elibrary.ru/uwbzwm>
- Merker M., Barbier M., Cox H., et al. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia. *Elife*. 2018;7:e38200. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38200>
- 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>
- Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н. и др. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулеза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62(10):622–7. Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., et al. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017;62(10):622–7. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627> EDN: <https://elibrary.ru/zoladv>
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*. 2011;17(1):10–2. DOI: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Хромова П.А., Синьков В.В., Савилов Е.Д. и др. Распространение эндемичных субклонов Beijing B0/W148 *M. tuberculosis* на территориях Сибирского и Дальневосточного федеральных округов по результатам полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020;19(3):41–5. Khromova P.A., Sinkov V.V., Savilov E.D., et al. Dispersal of Beijing B0/W148 *M. tuberculosis* endemic subclones in territories of the Siberia and Far Eastern Federal District by whole genome study. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(3):41–5. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-3-41-45>
- 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>
- Zhdanova S., Mokrousov I., Orlova E., et al. Transborder molecular analysis of drug-resistant tuberculosis in Mongolia and Eastern Siberia, Russia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022;69(5):e1800–14. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14515>
- Жданова С.Н., Огарков О.Б., Алексеева Г.И. и др. Генетическое разнообразие изолятов микобактерий туберкулеза из Республики Саха (Якутия), Россия. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016;34(2):43–8. Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Sinkov V.V., et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2016;31(2):51–7. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416816020105> EDN: <https://elibrary.ru/xfjfst>
- Умпелева Т.В., Белоусова К.В., Голубева Л.А. и др. Генетический полиморфизм возбудителя туберкулеза на территории города с ограниченной миграцией населения и высоким уровнем заболеваемости ВИЧ-инфекцией. *Туберкулез и болезни легких*. 2019;97(3):40–5. Umpeleva T.V., Belousova K.V., Golubeva L.A., et al. Genetic polymorphism of tuberculosis mycobacteria in the city with limited population migration and high incidence of HIV infection. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019;97(3):40–5. DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-3-40-45> EDN: <https://elibrary.ru/ewwuwz>
- Жданова С.Н., Огарков О.Б., Савилов Е.Д., Кондратов И.Г. Применение молекулярно-генетических инструментов для оценки трансграничной передачи туберкулеза в Иркутской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(2):59–65. Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Savilov E.D., Kondratov I.G. Application of new molecular genetic strategies for transborder transmission analysis of tuberculosis in Irkutsk region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(2):59–65. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-2-59-65> EDN: <https://elibrary.ru/ymgdfc>
- Микова О.Е., Жданова С.Н., Сергеев В.И. и др. Высокая распространённость генотипа B0/W148 *Mycobacterium tuberculosis* у больных ВИЧ-инфекцией, сочетанной с туберкулезом, в Пермском крае и Иркутской области. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2016;1(5):142–5. Mikova O.E., Zhdanova S.N., Sergeev V.I., et al. High prevalence of genotype B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* among HIV-TB patients in Perm Krai and Irkutsk region. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS*. 2016;1(5):142–5. DOI: <https://doi.org/10.12737/23412> EDN: <https://elibrary.ru/wxbrvf>
- Вязовая А.А., Лебедева И.А., Ушакова Н.Б. и др. Молекулярно-генетический анализ популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Вологодской области — регионе с низкой заболеваемостью туберкулезом. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(3):497–505. Vyazovaya A.A., Lebedeva I.A., Ushakova N.B., et al. Molecular and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* population in the Vologda Region with low tuberculosis incidence. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(3):497–505. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-MAG-1545> EDN: <https://elibrary.ru/tmhfej>
- 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>
18. Engström A., Antonenka U., Kadyrov A., et al. Population structure of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Central Asia. *BMC Infect. Dis.* 2019;19(1):908.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4480-7>.
19. Klotoe B.J., Kacimi S., Costa-Conceição E., et al. Genomic characterization of MDR/XDR-TB in Kazakhstan by a combination of high-throughput methods predominantly shows the ongoing transmission of L2/Beijing 94-32 central Asian/Russian clusters. *BMC Infect. Dis.* 2019;19(1):553.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4201-2>
20. Aуганова D., Atavliyeva S., Amirgazin A., et al. Genomic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* L2/Beijing isolates from Astana, Kazakhstan. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(10):1523.
DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101523>
21. Akhmetova A., Bismilda V., Chingissova L., et al. Prevalence of Beijing Central Asian/Russian cluster 94-32 among multidrug-resistant *M. tuberculosis* in Kazakhstan. *Antibiotics (Basel)*. 2024;13(1):9. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010009>
22. Fursov M.V., Shitikov E.A., Bespyatykh J.A., et al. Genotyping, assessment of virulence and antibacterial resistance of the Rostov strain of *Mycobacterium tuberculosis* attributed to the Central Asia Outbreak clade. *Pathogens*. 2020;9(5):335.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050335>
23. Савинов Л.В., Варкентин А.В. Управление миграционными процессами в Кемеровской области. *Развитие территории*. 2019;(1):33–8. Savinov L.V., Varkentin A.V. Management of migration processes in Kemerovo Region. *Territory Development*. 2019;(1):33–8.
DOI: <https://doi.org/10.32324/2412-8945-2019-1-33-38>
EDN: <https://elibrary.ru/bpnbxl>
24. Цыбикова Э.Б., Гадирова М.Э., Мидоренко Д.А. Заболеваемость туберкулезом среди трудовых мигрантов в России. *Туберкулез и болезни легких*. 2021;99(11):35–42. Tsybikova E.B., Gadirova M.E., Midorenko D.A. Tuberculosis incidence among migrant workers in Russia. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2021;99(11):35–42.
DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-11-35-41>
EDN: <https://elibrary.ru/hahkjbb>
25. Фелькер И.Г., Волик М.В., Джурабаева Г.К., Гордеева Е.И. Оценка своевременности выявления туберкулеза среди иностранных граждан Новосибирской области. *Туберкулез и болезни лёгких*. 2022;100(8):18–24. Felker I.G., Volik M.V., Dzhurabaeva G.K., Gordeeva E.I. Assessment of timeliness of tuberculosis detection among foreign citizens in Novosibirsk Oblast. *Tuberculosis and Lung Diseases*.
DOI: <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-8-18-24>
EDN: <https://elibrary.ru/difpas>
26. Савина А.А., Лукманов А.С., Землянова Е.В. Тенденции смертности от ВИЧ-инфекции в регионах Российской Федерации. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023;15(2):81–9. Savina A.A., Lukmanov A.S., Zemlyanova E.V. HIV-mortality trends in the regions of Russian Federation. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2023;15(2):81–9.
DOI: <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-2-81-89>
EDN: <https://elibrary.ru/natkib>
27. Melsew Y.A., Doan T.N., Gambhir M., et al. Risk factors for infectiousness of patients with tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol. Infect.* 2018;146(3):345–53.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268817003041>
28. Saavedra Cervera B., López M.G., Chiner-Oms Á., et al. Fine-grain population structure and transmission patterns of *Mycobacterium tuberculosis* in southern Mozambique, a high TB/HIV burden area. *Microb. Genom.* 2022;8(7):mgen000844.
DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000844>

Информация об авторах

Жданова Светлана Николаевна — д. м. н., в. н. с. Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, svetnii@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7160-9700>

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

Лебедева Ирина Борисовна — ассистент каф. эпидемиологии и инфекционных болезней Кемеровского государственного медицинского университета, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3848-9206>

Синьков Вячеслав Владимирович — к. м. н., с. н. с. Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>

Кондратов Илья Геннадьевич — к. б. н., н. с. Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Шварц Яков Шмульевич — д. м. н., заместитель директора по научной работе Новосибирского НИИ туберкулеза, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3036-9795>

Рычкова Любовь Владимировна — д. м. н., директор Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0117-2563>

Брусина Елена Борисовна — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. каф. эпидемиологии и инфекционных болезней Кемеровского государственного медицинского университета, Кемерово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

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

Information about the authors

Svetlana N. Zhdanova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, svetnii@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7160-9700>

Anna A. Vyazovaya — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>

Irina B. Lebedeva — assistant, Department of epidemiology and infectious diseases, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3848-9206>

Vyacheslav V. Sinkov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>

Ilya G. Kondratov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Yakov Sh. Schwartz — D. Sci. (Med.), Deputy Director for Science, Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, <https://orcid.org/0000-0002-3036-9795>

Lyubov V. Rychkova — D. Sci. (Med.), Director, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0117-2563>

Elena B. Brusina — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Head, Department of epidemiology and infectious diseases, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8616-3227>

Igor V. Mokrousov — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5924-0576>

Огарков Олег Борисович — д. м. н., г. н. с., директор Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Участие авторов: *Жданова С.Н., Вязовая А.А.* — концептуализация; *Огарков О.Б., Мокроусов И.В., Брусина Е.Б.* — методология; *Синьков В.В.* — программное обеспечение, биоинформационный анализ и визуализация; *Кондратов И.Г., Лебедева И.Б., Шварц Я.Ш.* — валидация; *Рычкова Л.В.* — ресурсы и администрирование; *Жданова С.Н., Лебедева И.Б., Вязовая А.А.* — курирование данных; *Жданова С.Н., Вязовая А.А., Огарков О.Б., Мокроусов И.М., Брусина Е.Б.* — написание и подготовка рукописи к публикации. 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 05.08.2024;
принята к публикации 10.10.2024;
опубликована 29.10.2024

Oleg B. Ogarkov — D. Sci. (Med.), chief researcher, Director, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Author contribution: *Zhdanova S.N., Vyazovaya A.A.* — conceptualization; *Ogarkov O.B., Mokrousov I.V., Brusina E.B.* — methodology; *Sinkov V.V.* — software, bioinformatics analysis and visualization; *Kondratov I.G., Lebedeva I.B., Schwartz Ya.Sh.* — validation; *Rychkova L.V.* — resources and administration; *Zhdanova S.N., Lebedeva I.B., Vyazovaya A.A.* — data curation; *Zhdanova S.N., Vyazovaya A.A., Ogarkov O.B., Mokrousov I.M., Brusina E.B.* — writing and preparing the manuscript for publication. 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 05.08.2024;
accepted for publication 10.10.2024;
published 29.10.2024



Получение нового варианта растворимого тримера Env ВИЧ-1 CRF63_02A6 SOSIP.664

Рудометова Н.Б.[✉], Рудометов А.П., Фандо А.А., Вахитов Д.И.,
Ильичев А.А., Агафонов А.П., Карпенко Л.И.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Россия

Аннотация

Введение. Получение стабилизированных рекомбинантных тримеров Env вируса иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1), близких к нативной конформации, является одним из направлений в разработке вакцин против ВИЧ-1.

Цель работы — получить и охарактеризовать стабилизированный тример Env ВИЧ-1 SOSIP.664 на основе циркулирующего генетического варианта рекомбинантной формы CRF63_02A6.

Материалы и методы. Для дизайна гена тримера Env на основе генетического варианта ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF63_02A6 использовали биоинформатические ресурсы. Спроектированный ген синтезирован и клонирован в составе интеграционного плазмидного вектора, с использованием которого получен стабильный продуцент тримера Env на основе клеточной линии CHO-K1. Очистку белкового комплекса проводили с помощью аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Антигенные свойства тримера Env исследовали с помощью иммунохимического анализа с использованием широко нейтрализующих ВИЧ-1 моноклональных антител (bnAbs).

Результаты. Спроектирован новый вариант стабилизированного тримера Env поверхностного гликопротеина рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1 SOSIP.664, включающего дополнительные стабилизирующие модификации. На основе клеточной линии CHO-K1 получен продуцент, стабильно продуцирующий спроектированный тример Env, и разработан протокол его очистки. Установлено, что тример Env CRF63_02A6 SOSIP.664 эффективно распознается bnAbs 2G12, VRC01 и PGT126.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения структурных особенностей тримера Env CRF63_02A6 SOSIP.664, а также его иммуногенности и возможности использования в качестве вакцинного антигена.

Ключевые слова: ВИЧ-1, CRF63_02A6, тример Env, SOSIP.664

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках Соглашения от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355, в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры. Характеристика Env тримера с использованием моноклональных широко нейтрализующих антител выполнена в рамках Государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Рудометова Н.Б., Рудометов А.П., Фандо А.А., Вахитов Д.И., Ильичев А.А., Агафонов А.П., Карпенко Л.И. Получение нового варианта растворимого тримера Env ВИЧ-1 CRF63_02A6 SOSIP.664. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):641–649.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-590>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-590>

Production of a new variant of soluble trimer Env of HIV-1 CRF63_02A6 SOSIP.664

Nadezhda B. Rudometova[✉], Andrey P. Rudometov, Anastasia A. Fando, Danil I. Vahitov, Alexander A. Ilyichev, Alexander P. Agafonov, Larisa I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russia

Abstract

Introduction. Obtaining stabilized recombinant HIV-1 Env trimers that have a close to the native conformation is one of the directions in the field of development of vaccines against HIV-1.

The aim of the study was to obtain and characterize the stabilized trimer Env of HIV-1 SOSIP.664 based on the circulating genetic variant of the recombinant form CRF63_02A6.

Materials and methods. Bioinformatics resources were used to design the trimer Env gene based on the HIV-1 recombinant genetic variant CRF63_02A6. The designed gene was synthesized and cloned as part of an integration plasmid vector. A stable producer of trimer Env was obtained by transfection of the CHO-K1 cell line using the developed plasmid vector. Purification of the protein complex was performed using affinity chromatography and gel filtration. Antigenic properties of trimer Env were studied using immunochemical analysis using broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibodies (bnAbs).

Results. A new variant of the stabilized trimer Env of the surface glycoprotein of the recombinant form CRF63_02A6 HIV-1 SOSIP.664 was designed, including additional stabilizing modifications. Based on the CHO-K1 cell line, a stable producer was obtained and a purification protocol for the designed trimer Env was developed. It was found that the trimer Env CRF63_02A6 SOSIP.664 is effectively recognized by bnAbs 2G12, VRC01 and PGT126.

Conclusion. The obtained results indicate the prospects for further study of the structural features of the trimer Env CRF63_02A6 SOSIP.664, as well as its immunogenicity and the possibility of using it as a vaccine antigen.

Keywords: HIV-1, CRF63_02A6, Env trimers, SOSIP.664

Funding source. The research was performed under Agreement No. 075-15-2021-1355 dated 12.10.2021, as part of the implementation of certain activities of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Synchrotron and Neutron Research as well as Research Infrastructure. The characterization of the Env trimer using monoclonal broadly neutralizing antibodies was performed within the framework of the State Task of the Federal State Budgetary Institution SSC VB "Vector" of Rospotrebnadzor.

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

For citation: Rudometova N.B., Rudometov A.P., Fando A.A., Vahitov D.I., Ilyichev A.A., Agafonov A.P., Karpenko L.I. Production of a new variant of soluble trimer Env of HIV-1 CRF63_02A6 SOSIP.664. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):641–649.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-590>

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

Введение

Согласно данным Объединённой программы ООН по ВИЧ/СПИД (ЮНЭЙДС), общее число людей во всём мире, живущих с ВИЧ-1, в 2023 г. составило 39,9 млн человек, а число новых случаев инфицирования ВИЧ — более 1 млн человек¹. В России в 2023 г. проживало около 1,2 млн человек с подтверждённым диагнозом «ВИЧ-инфекция»².

Разработка эффективной вакцины для профилактики ВИЧ-инфекции продолжает оставаться одной из острых нерешённых проблем.

Индукция иммунного ответа, способного предотвратить заражение различными подтипами ВИЧ-1, является важнейшей целью для вакцин, которые будут защищать от заражения ВИЧ-1. Известно, что широко нейтрализующие антитела (broadly neutralizing HIV-1 antibodies, bnAbs) могут предотвратить заражение ВИЧ-1 путём связывания с поверхностными гликопротеинами оболочки (envelope glycoprotein, Env) на поверхности вириона [1–4]. Активно ведутся работы по получению нативных комплексов Env для изучения их иммуногенности и определения пригодности

¹ Информационный бюллетень ЮНЭЙДС 2024. Глобальная статистика по ВИЧ. URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_ru.pdf (дата обращения: 28.09.2024).

² ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 30 июня 2023 г. URL: <https://files.antispidnn.ru/uploads/docs/spec/vich2023.pdf> (дата обращения: 18.09.2024).

сти в качестве вакцинного антигена [5–8]. За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в этой области. Так, были разработаны различные модификации, включая SOSIP.664, которые позволили получить стабилизированную структуру рекомбинантных тримеров Env, близкую к нативной конформации, и таким образом повысить их способность индуцировать желаемые ответы NAb против гетерологичных вирусов [6, 9, 10]. Получены варианты стабилизированных тримеров Env генетических подтипов ВИЧ-1 (А, В и С), циркулирующих преимущественно в странах Европы, Америки и Африки, которые показали способность индуцировать нейтрализующие антитела [6, 8, 11].

В регионах Сибири в настоящее время доминирует рекомбинантная форма CRF63_02A6 [12, 13]. По данным M. V. Sivaу и соавт., рекомбинантная форма CRF63_02A6 впервые была зарегистрирована в Новосибирской области в 2006 г. [14]. После этого она активно распространилась по другим территориям Сибири (Омск, Алтай, Томск, Красноярск и Кемерово), вытесняя подтип А6 и становясь доминирующим. К 2020 г. CRF63_02A6 был обнаружен в 20 регионах России и 6 странах Центральной Азии. В исследовании авторов показано, что CRF63_02A6 обнаруживаются более чем в 80% новых случаев ВИЧ-1 в Сибири [14].

Целью данной работы являлось получение стабилизированного тримера Env рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1 SOSIP.664, включающего дополнительные стабилизирующие модификации.

Материалы и методы

Моноклональные антитела, штаммы бактерий, клеточные линии

Моноклональные антитела PGT126, 2G12, VRC01 получены в рамках программы предоставления реактивов «NIH HIV Reagent Program». Клеточная линия CHO-K1 взята из Коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Дизайн стабилизированного тримера Env рекомбинантной формы CRF63_02A6

Дизайн нуклеотидной последовательности, кодирующей тример Env ВИЧ-1, осуществляли на основе гена *env* 22RUAR13 рекомбинантной формы CRF63_02A6 (Коллекция бактерий, бактериофагов и грибов ГНЦ ВБ «Вектор», регистрационный номер P-124) с помощью программ «SnapGene v. 3.2.1» и «BioEdit v. 7.2.5». Моделирование проводили с использованием нейросети AlphaFold2 colab program³; визуализировали с использованием онлайн-инстру-

мента RCSB PDB website, Mol*Plugin 3.43.1 3D Viewer tool. После проектирования проводили оптимизацию кодонного состава гена для экспрессии в клетках млекопитающих с использованием онлайн-инструмента Codon Adaptation Tool⁴. Синтез гена был проведен фирмой «ДНК-синтез». Полученный ген клонировали в составе интеграционного плазмидного вектора⁵. Целостность генетической конструкции подтверждали с помощью секвенирования (ЦКП «Геномика» Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Получение стабильного продуцента тримера Env рекомбинантной формы CRF63_02A6 SOSIP.664

Стабильный продуцент тримера Env получали на основе клеточной линии CHO-K1, как описано в работе [15]. После получения поликлонального клеточного пула его использовали для выделения моноклональных клеточных культур. Для этого поликлональную клеточную культуру рассевали в 96-луночный планшет по 1 клетке на лунку в 200 мкл полной ростовой среды DMEM/F12 («Servicebio»), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HiMedia») и антибиотик пуромидин («Invivogen») в концентрации 10 мкг/мл и растили до достижения монослоя в течение 7–14 дней. По истечении этого времени выросшие моноклональные культуры пересевали в 24-луночный планшет. После того как моноклональные клеточные линии сформировали монослой, их анализировали на предмет экспрессии трансгена с помощью дот-блот-анализа.

Затем выбранную моноклональную культуру использовали для наработки белка. Моноклональную культуру клеток CHO-K1-gp140.SOSIP.664.opt культивировали в роллерных флаконах в течение 7 дней, затем культуральную среду собирали и центрифугировали для удаления клеточного дебриса. Проводили процедуру очистки с использованием IMAC SepLife FF («Sunresin»). Степень очистки целевого белка оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в присутствии/отсутствии восстанавливающих агентов с последующим окрашиванием Кумасси G250. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и диализовали против буфера

⁴ URL: <https://www.jcat.de>

⁵ Патент № 2800471 Российская Федерация, МПК C12N15/00 (2006.01), C07K16/10 (2006.01), C12N1/00 (2006.01), C12N15/63 (2006.01). Плазмидная генетическая конструкция pVEAL3-10H10ch, штамм рекомбинантной клеточной линии CHO-K1-10H10ch и химерное антитело 10H10ch против вируса клещевого энцефалита, продуцируемое указанным штаммом клеточной линии CHO-K1-10H10ch : 2022126714 : заявл. 13.10.2022; опубл. 21.07.2023 / Шаньшин Д.В., Несмеянова В.С., Щербakov Д.Н. и др. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2800471C1/ru> (дата обращения: 18.09.2024).

³ URL: <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>

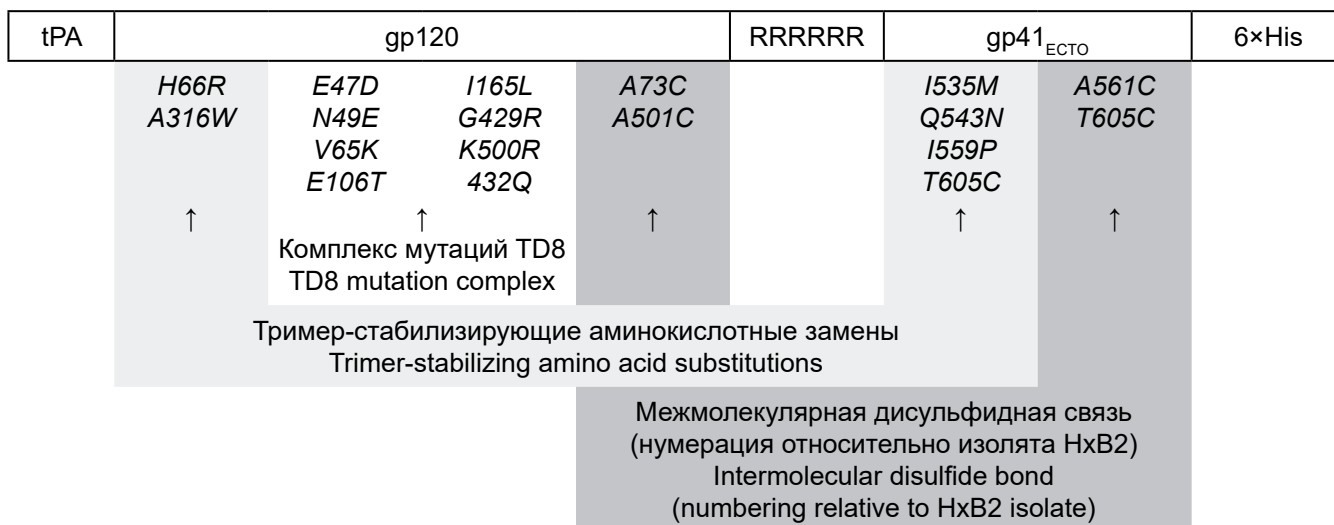


Рис. 1. Схема дизайна тримера Env gp140.SOSIP.664.opt.

Fig. 1. Design of the Env trimer gp140.SOSIP.664.opt.

(75 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0); концентрировали с использованием центрифужного концентратора («Jet Biofil») на 100 кДа. После этого аффинно-очищенные белки разделяли методом эксклюзионной хроматографии с использованием колонки «Chrom-LinX 16/1000 Tiderose GF200» («Taidu Biotech») при скорости потока 1 мин/мл.

Дот-блот- и вестерн-блот-анализы

Дот-блот- и вестерн-блот-анализы проводили по стандартной методике с помощью системы «SNAP i.d. 2.0» («Millipore») и bnAb PGT126. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против IgG человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой («Sigma»). Визуализацию иммунного комплекса проводили добавлением раствора NBT/BCIP («Sigma»).

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили по стандартной методике. В качестве первичных антител использовали bnAbs PGT126, 2G12, VRC01, в качестве вторичных — антитела козы против IgG человека, меченные пероксидазой хрена («Sigma»). В качестве хромогенного субстрата применяли раствор тетраметилбензидина («Имтэк»). Реакцию останавливали 1 Н раствором соляной кислоты. Оптическую плотность измеряли на приборе «Varioskan LUX» («Thermo Scientific») при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «GraphPad Prism 9» («GraphPad Software Inc.»).

Результаты

В данной работе для дизайна использовали охарактеризованный ген *env* 22RUAR13, который

относится к актуальной рекомбинантной форме CRF63_02A6 ВИЧ-1, циркулирующей в настоящее время в Сибирском регионе. Для улучшения образования растворимых тримеров конструкция содержала следующие изменения по сравнению с природной последовательностью: природный сигнальный пептид заменяли на сигнальную последовательность tPA (tissue plasminogen activator signal peptide); вводили 2 цистеина для формирования дисульфидной связи gp120-gp41 (501C и 605C); вносили стабилизирующие аминокислотные замены в gp41 (*I559P*, *H66R* и *A316W*); для улучшенной тримеризации вносили аминокислотные замены в gp41 (*I535M* и *Q543N*) и комплекс мутаций TD8 (*E47D*, *N49E*, *V65K*, *E106T*, *I165L*, *G429R* и *K500R*; *432Q*); для усиления расщепления мотив REKR в gp120 заменяли на RRRRRR (R6); также удаляли MPER-область, трансмембранный и цитоплазматический домены для лучшей экспрессии проектируемого белка; после аминокислотного остатка 664 на

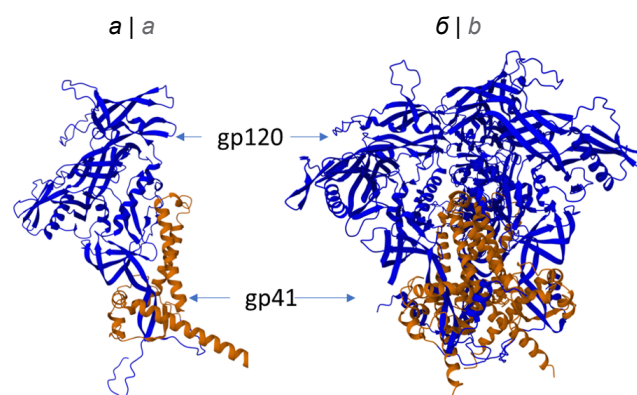


Рис. 2. Пространственная модель мономера (а) и тримера (б) gp140.SOSIP.664.opt.

Fig. 2. Structure model of the monomer (a) and trimer (b) of gp140.SOSIP.664.opt.



Рис. 3. Дот-блот-анализ культуральной среды, собранной с моноклональных клеточных культур CHO-K1-gp140.SOSIP.664.opt.

В качестве K+ использован рекомбинантный тример Env CRF63_02A6, в качестве K- — культуральная среда, собранная с нетрансформированных клеток CHO-K1.

Fig. 3. Dot blot analysis of the culture medium collected from monoclonal cell cultures CHO-K1-gp140.SOSIP.664.opt.

Recombinant Env trimer CRF63_02A6 was used as K+, and culture medium collected from non-transformed CHO-K1 cells was used as K-.

С-конце добавляли 6×His для последующей очистки [6] (**рис. 1**). Полученный вариант тримера Env рекомбинантной формы CRF63_02A6 обозначили как gp140.SOSIP.664.opt.

Моделирование пространственной структуры показало, что спроектированная аминокислотная последовательность способна формировать специфические мономеры и тримерные комплексы (**рис. 2**).

Далее путём трансфекции клеточной линии CHO-K1 была получена поликлональная клеточная культура CHO-K1-gp140.SOSIP.664.opt, которую использовали для выделения моноклональных клеточных линий методом предельного разведения. В итоге были получены 24 моноклональные культуры, которые с помощью дот-блот-анализа исследовали на способность продуцировать целевой белок в культуральную среду. В результате была определена моноклональная культура (№ 11) с высокой экспрессией трансгена (**рис. 3**), которую использовали для дальнейшей работы.

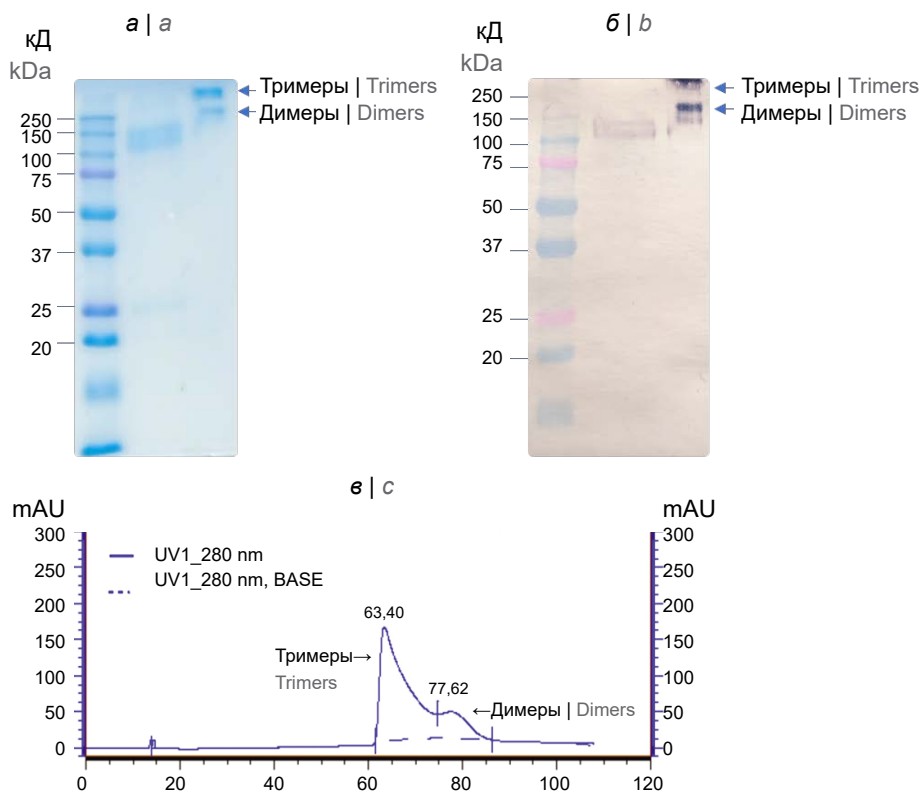


Рис. 4. Характеристика тримера Env gp140.SOSIP.664.opt.

a — электрофореграмма разделения рекомбинантного тримера Env в 12% ПААГ: 1 — маркер молекулярного веса белков Precision Plus Dual Color Standards («Bio-Rad»); 2 — в присутствии β-меркаптоэтанола; 3 — в отсутствие β-меркаптоэтанола; *б* — иммуноблоттинг тримера Env с моноклональным антителом PGT126: 1 — маркер молекулярного веса белков Precision Plus Dual Color Standards («Bio-Rad»); 2 — в присутствии β-меркаптоэтанола; 3 — в отсутствие β-меркаптоэтанола; *в* — профиль эксклюзионной хроматографии тримера Env на колонке «Chrom-LinXTM 16/1000 Tiderose GF200».

Fig. 4. Characterization of the Env protein.

a — electropherogram of separation of recombinant Env trimer gp140.SOSIP.664.opt in 12% PAGE: 1 — molecular weight marker of proteins Precision Plus Dual Color Standards (Bio-Rad, USA); 2 — in the presence of β-mercaptoethanol; 3 — in the absence of β-mercaptoethanol. *b* — immunoblotting of Env trimer gp140.SOSIP.664.opt with monoclonal antibody PGT126: 1 — molecular weight marker of proteins Precision Plus Dual Color Standards (Bio-Rad, USA); 2 — in the presence of β-mercaptoethanol; 3 — in the absence of β-mercaptoethanol; *c* — profile of size-exclusion chromatography of Env trimer gp140.SOSIP.664.opt on a Chrom-LinXTM 16/1000 Tiderose GF200 column.

Для препаративной наработки целевого белка проводили культивирование моноклональной клеточной культуры CHO-K1-gp140.SOSIP.664.opt в роллерных бутылках с последующей очисткой рекомбинантного тримера Env. По окончании культивирования культуральную среду собирали, и целевой белок очищали с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, диализа и последующей гель-фильтрации. Продукция белка составила около 15 мг/л.

Препарат очищенного белка Env характеризовали с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии или в отсутствие β-меркаптоэтанола. Исходя из аминокислотной последовательности рекомбинантного Env CRF63_02A6 (683 а. о.), теоретически рассчитанная молекулярная масса мономера должна составлять 76,8 кДа. Однако известно, что в эукариотических клетках белок Env ВИЧ-1 сильно гликозилируется и около 50% его молекулярной массы могут составлять гликаны [16, 17], в результате масса мономера увеличивается до 140 кДа. В культуре эукариотических клеток гликозилирование белка Env может быть неполным, и могут быть промежуточные продукты гликозилирования. По этой причине в случае электрофореза в денатурирующих условиях (в присутствии β-меркаптоэтанола) наблюдаются 2 бэнда в ПААГ (рис. 4, а), различающиеся примерно на 10–20 кДа, которые представляют собой мономеры рекомбинантного тримера Env с разной степенью гликозилирования. Оба они узнаются моноклональным антителом PGT126 (рис. 4, б).

В отсутствие β-меркаптоэтанола (рис. 4, а, дорожка 3) в ПААГ мономерные формы белка отсутствуют, а детектируются олигомеры более высокого порядка (более 250 кДа).

С помощью гель-фильтрации на предварительно откалиброванной колонке Chrom-LinX 16/1000 Tiderose GF200 («Taidu Biotech») установлено, что основной пик целевого белка выходит в области, соответствующей тримерной форме (рис. 4, в).

Для изучения антигенных свойств тримера Env проведён иммуноферментный анализ с использованием bnAbs 2G12, VRC01 и PGT126, нацеленных на эпитоп, включающий углеводные остатки в позициях 295, 332 и 392, CD4-связывающий сайт и V3-петлю на поверхности gp120 соот-

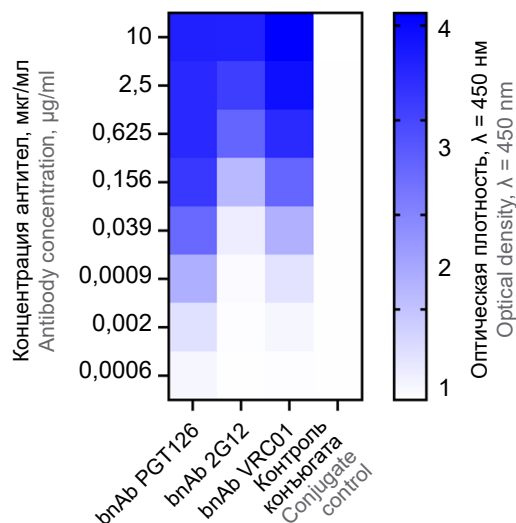


Рис. 5. Специфическая активность моноклональных широко нейтрализующих антител в отношении тримера Env рекомбинантной формы CRF63_02A6 gp140.SOSIP.664.opt (представлена в виде тепловой карты). Количество сорбированного антигена составляло 100 нг/лунка.

Fig. 5. Specific activity of monoclonal broadly neutralizing antibodies against Env trimer of the recombinant form CRF63_02A6 gp140.SOSIP.664.opt (presented as a heat map). The amount of absorbed antigen was 100 ng/well.

ветственно. Установлено, что полученный тример Env gp140.SOSIP.664.opt эффективно распознается моноклональными широко нейтрализующими антителами (рис. 5), что может свидетельствовать о правильной укладке и сохранении конформации синтезируемого в клетках-производителях тримера Env. Значения EC_{50} для bnAbs 2G12, VRC01 и PGT126 составили 0,313, 0,098 и 0,019 мкг/мл соответственно (таблица).

Обсуждение

В мире активно исследуются тримеры Env различных подтипов ВИЧ-1 с точки зрения как структурных и антигенных особенностей, так и иммуногенных свойств [6–8, 11]. Так, с помощью биохимических и структурных подходов подробно были охарактеризованы нативные тримеры Env клад А, В, С и G [20–26], а также тримеры Env на основе консенсусной последовательности клады С [27] и группы М [6] соответственно.

Значения EC_{50} (мкг/мл), вычисленные для gp140.SOSIP.664.opt, в сравнении с данными литературы
 EC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$) calculated for gp140.SOSIP.664.opt compared with literature data

bnAbs	gp140.SOSIP.664.opt (CRF63_02A6)	BG505 (A)	JR-FL (B)	B41 (B)
PGT126	0,019	0,026–0,06 [18, 19]	Н. д. N. d.	Н. д. N. d.
2G12	0,313	0,027–0,07 [18, 19]	0,21 [19]	0,13 [19]
VRC01	0,098	0,163–1,35 [18, 19]	0,67 [19]	5,20 [19]

Примечание. Н. д. — нет данных.

Note. N. d. — no data.

Преимущественно исследования сосредоточены на подтипах А, В и С, при этом практически отсутствуют данные по различным CRF [28], в частности рекомбинантной форме CRF63_02A6, которая быстро распространяется в регионах России и в настоящее время доминирует в Сибирском федеральном округе [12–14].

Ранее нами получен тример Env рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1, при проектировании которого также использовали нуклеотидную последовательность гена *env* рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1 и известные модификации SOSIP.664 [29]: межмолекулярная дисульфидная связь (SOS, A501C-T605C) для связывания gp120 и gp41; улучшенный сайт (RRRRRR) расщепления фурином; точечная замена I559P, способствующая стабилизации субъединиц gp41 в конформации до слияния; удаление MPER-области, трансмембранного и цитоплазматического доменов для лучшей экспрессии; добавление 6×His на С-конце для последующей очистки; сигнальный пептид оставляли природный. С помощью иммунохимических анализов показано, что синтезируемые в клетках CHO-K1 тримеры распознаются как моноклональными широко нейтрализующими антителами, так и сыворотками ВИЧ-положительных пациентов [15].

Позже были получены кристаллические структуры BG505 SOSIP высокого разрешения, которые позволили идентифицировать дополнительные положения аминокислотных остатков, участвующие в стабилизации тримера и способствующие формированию хорошо упорядоченных, однородных и высокостабильных растворимых тримеров [6, 30]. Полученные с учётом этих данных модифицированные тримеры Env BG505 SOSIP.664-140 продемонстрировали способность индуцировать специфический гуморальный иммунный ответ у лабораторных животных. Было показано, что такой комплекс SOSIP.664-140 активно узнаётся нейтрализующими моноклональными антителами и, напротив, с ним не связываются не-нейтрализующие антитела [18].

В данной работе с использованием биоинформатических ресурсов проведён дизайн тримера Env gp140.SOSIP.664.opt рекомбинантной формы CRF63_02A6, в структуру которого, наряду с дисульфидной связью SOS (A501C-T605C) и аминокислотной заменой I559P, были введены дополнительные аминокислотные замены и комплекс мутаций TD8 в gp120, приводящие к дополнительной стабилизации белкового комплекса [6]. В результате получен оптимизированный стабилизированный тример Env CRF63_02A6 ВИЧ-1. Компьютерное моделирование с помощью «AlphaFold2» показало, что спроектированная аминокислотная последовательность способна сворачиваться в мономеры и тримерные комплексы (рис. 1, б).

С помощью электрофореза в ПААГ и вестерн-блот-анализа установлено, что в присутствии β-меркаптоэтанола очищенный тример Env CRF63_02A6 ВИЧ-1 денатурирует до мономера (молекулярная масса ~140 кДа; рис. 4, а), который специфически распознаётся bnAb PGT126 (рис. 4, б). В отсутствие β-меркаптоэтанола фракция мономера отсутствует, что свидетельствует о стремлении белка собираться в более крупные структуры (рис. 4, а). С помощью гель-фильтрации выявлено, что белок в растворе находится преимущественно в тримерной форме (рис. 4, в).

При культивировании клеток CHO-K1-gp140.SOSIP.664.opt тример Env регистрировался в культуральной среде, что свидетельствует о его растворимости. Тот факт, что полученный тример Env эффективно узнаётся моноклональными широко нейтрализующими антителами bnAbs 2G12, VRC01 и PGT126 (рис. 5), распознающими конформационные эпитопы на поверхности Env в составе вирусной частицы, свидетельствует о его правильной укладке и сохранении конформации. Следует отметить, что значения EC₅₀, полученные для gp140.SOSIP.664.opt тримера Env, отличаются от EC₅₀ для тримеров Env других подтипов ВИЧ-1 (таблица). Это может свидетельствовать о наличии антигенных различий вышеуказанных штаммов ВИЧ-1.

Заключение

Создан и охарактеризован оптимизированный стабилизированный тример Env ВИЧ-1 gp140.SOSIP.664.opt на основе актуального циркулирующего генетического варианта рекомбинантной формы CRF63_02A6. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения его структурных особенностей, иммуногенности и возможности использования в качестве вакцинного антигена.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Jones L.D., Moody M.A., Thompson A.B. Innovations in HIV-1 vaccine design. *Clin. Ther.* 2020;42(3):499–514. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.01.009>
2. Kumar S., Singh S., Luthra K. An overview of human anti-HIV-1 neutralizing antibodies against diverse epitopes of HIV-1. *ACS Omega.* 2023;8(8):7252–61. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07933>
3. Thavarajah J.J., Hønge B.L., Wejse C.M. The use of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) in HIV-1 treatment and prevention. *Viruses.* 2024;16(6):911. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16060911>
4. Caskey M. Broadly neutralizing antibodies for the treatment and prevention of HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2020;15(1):49–55. DOI: <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000600>
5. Vzorov A.N., Wang L., Chen J., et al. Effects of modification of the HIV-1 Env cytoplasmic tail on immunogenicity of VLP vaccines. *Virology.* 2016;489:141–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.015>
6. Slieden K., Han B., Bontjer I., et al. Structure and immunogenicity of a stabilized HIV-1 envelope trimer based on a group-M

- consensus sequence. *Nat. Commun.* 2019;10(1):2355. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10262-5>
7. Olia A.S., Cheng C., Zhou T., et al. Soluble prefusion-closed HIV-envelope trimers with glycan-covered bases. *iScience.* 2023;26(8):107403. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107403>
 8. Zhao F., Joyce C., Burns A., et al. Mapping neutralizing antibody epitope specificities to an HIV Env trimer in immunized and in infected rhesus macaques. *Cell Rep.* 2020;32(10):108122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108122>
 9. Sanders R.W., Moore J.P. Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design. *Immunol. Rev.* 2017;275(1):161–82. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12481>
 10. Torrents de la Peña A., Sanders R.W. Stabilizing HIV-1 envelope glycoprotein trimers to induce neutralizing antibodies. *Retrovirology.* 2018;15(1):63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0445-y>
 11. Schorcht A., van den Kerkhof T.L.G.M., Cottrell C.A., et al. Neutralizing antibody responses induced by HIV-1 envelope glycoprotein SOSIP trimers derived from elite neutralizers. *J. Virol.* 2020;94(24):e01214-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01214-20>
 12. Maksimenko L.V., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., et al. Genetic diversity of HIV-1 in Krasnoyarsk Krai: Area with high levels of HIV-1 recombination in Russia. *Biomed. Res. Int.* 2020;2020:9057541. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/9057541>
 13. Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., et al. Genetic diversity and drug resistance mutations in reverse transcriptase and protease genes of HIV-1 isolates from Southwestern Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2021;37(9):716–23. DOI: <https://doi.org/10.1089/AID.2020.0225>
 14. Sivay M.V., Maksimenko L.V., Osipova I.P., et al. Spatiotemporal dynamics of HIV-1 CRF63_02A6 sub-epidemic. *Front. Microbiol.* 2022;13:946787. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.946787>
 15. Rudometova N.B., Rudometov A.P., Fando A.A., et al. Production and study of immunochemical properties of stabilized Env trimer of recombinant form CRF63_02A6 of HIV-1. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023;176(1):96–100. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05978-w>
 16. Rathore U., Saha P., Kesavardhana S., et al. Glycosylation of the core of the HIV-1 envelope subunit protein gp120 is not required for native trimer formation or viral infectivity. *J. Biol. Chem.* 2017;292(24):10197–219. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788919>
 17. Wang W., Nie J., Prochnow C., et al. A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. *Retrovirology.* 2013;10:14. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.1186/1742-4690-10-14>
 18. Sanders R.W., Derking R., Cupo A., et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003618. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003618>
 19. Cao L., Pauthner M., Andrabi R., et al. Differential processing of HIV envelope glycans on the virus and soluble recombinant trimer. *Nat. Commun.* 2018;9(1):3693. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06121-4>
 20. Julien J.P., Cupo A., Sok D., et al. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science.* 2013;342(6165):1477–83. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1245625>
 21. Lyumkis D., Julien J.P., de Val N., et al. Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science.* 2013;342(6165):1484–90. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1245627>
 22. Pancera M., Zhou T., Druz A., et al. Structure and immune recognition of trimeric prefusion HIV-1 Env. *Nature.* 2014;514(7523):455–61. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13808>
 23. Garces F., Lee J.H., de Val N., et al. Affinity maturation of a potent family of HIV antibodies is primarily focused on accommodating or avoiding glycans. *Immunity.* 2015;43(6):1053–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.007>
 24. Lee J.H., Ozorowski G., Ward A.B. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science.* 2016;351(6277):1043–8. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad2450>
 25. Stewart-Jones G.B.E., Soto C., Lemmin T., et al. Trimeric HIV-1-Env structures define glycan shields from clades A, B, and G. *Cell.* 2016;165(4):813–26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.010>
 26. Guenaga J., Garces F., de Val N., et al. Glycine substitution at helix-to-coil transitions facilitates the structural determination of a stabilized subtype C HIV envelope glycoprotein. *Immunity.* 2017;46(5):792–803. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.014>
 27. Rutten L., Lai Y.T., Blokland S., et al. A universal approach to optimize the folding and stability of prefusion-closed HIV-1 envelope trimers. *Cell Rep.* 2018;23(2):584–95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.061>
 28. Niu J., Wang Q., Zhao W., et al. Structures and immune recognition of Env trimers from two Asia prevalent HIV-1 CRFs. *Nat. Commun.* 2023;14(1):4676. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40321-x>
 29. Pugach P., Ozorowski G., Cupo A., et al. A native-like SOSIP.664 trimer based on an HIV-1 subtype B env gene. *J. Virol.* 2015;89(6):3380–95. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03473-14>
 30. Guenaga J., Dubrovskaya V., de Val N., et al. Structure-guided redesign increases the propensity of HIV Env to generate highly stable soluble trimers. *J. Virol.* 2015;90(6):2806–17. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02652-15>

Информация об авторах

Рудометова Надежда Борисовна[✉] — к. б. н., с. н. с. отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, nadenkaand100@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1684-9071>

Рудометов Андрей Павлович — к. б. н., в. н. с. отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2808-4309>

Фандо Анастасия Алексеевна — стажер-исследователь отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3325-3325>

Вахитов Данил Игоревич — аспирант, стажер-исследователь отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0009-0008-0706-8119>

Ильичев Александр Александрович — д. б. н., профессор, зав. отделом биоинженерии отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5356-0843>

Information about the authors

Nadezhda B. Rudometova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Bioengineering department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, nadenkaand100@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1684-9071>

Andrey P. Rudometov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Bioengineering department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2808-4309>

Anastasia A. Fando — research intern, Bioengineering department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3325-3325>

Danil I. Vahitov — graduate student, research intern, Bioengineering department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0009-0008-0706-8119>

Агафонов Александр Петрович — д. б. н., генеральный директор ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Карпенко Лариса Ивановна — д. б. н., в. н. с. отдела биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4365-8809>

Участие авторов: *Рудометова Н.Б.* — разработка концепции; проведение исследования; визуализация; подготовка и редактирование текста; утверждение окончательного варианта; *Рудометов А.П.* — разработка концепции; подготовка и редактирование текста; утверждение окончательного варианта; *Фандо А.А.* — проведение исследования; *Вахитов Д.И.* — проведение исследования; визуализация; *Ильичев А.А., Карпенко Л.И.* — подготовка и редактирование текста; утверждение окончательного варианта; *Агафонов А.П.* — ресурсное обеспечение исследования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.09.2024;
принята к публикации 23.10.2024;
опубликована 30.10.2024

Alexander A. Ilyichev — D. Sci. (Biol.), Professor, Head, Bioengineering department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5356-0843>

Alexander P. Agafonov — D. Sci. (Biol.), General director, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Larisa I. Karpenko — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Bioengineering department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4365-8809>

Author contribution: *Rudometova N.B.* — concept development; conducting research; visualization; text preparation and editing; approval of the final version; *Rudometov A.P.* — concept development; text preparation and editing; approval of the final version; *Fando A.A.* — conducting research; *Vahitov D.I.* — conducting research; visualization; *Ilyichev A.A., Karpenko L.I.* — text preparation and editing; approval of the final version; *Agafonov A.P.* — research resource support. 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 09.09.2024;
accepted for publication 23.10.2024;
published 30.10.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-505>



Самореплицирующиеся рекомбинантные вирусоподобные частицы лентивирусов, размножающиеся в клетках глиобластомы и макрофагах человека

Мошков Г.Д.¹, Мошков А.Е.^{2,3}, Мошков Д.А.^{1,2,3}

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

²US Pharma Biotechnology Inc., Балтимор, США;

³Global Virus Network, Балтимор, США

Аннотация

Введение. В борьбе с заболеваниями применяются аттенуированные и инактивированные вакцины. Инактивированные вакцины весьма разнообразны и включают цельноклеточные и бесклеточные вакцины, содержащие белковые целевые антигены, или нуклеиновые кислоты, кодирующие целевые антигены. Считается, что иммунитет, индуцируемый инактивированными вакцинами, не долговремен. Весьма проблематична разработка вакцин против вирусов, интегрирующихся в геном клеток хозяина, а также против персистирующих вирусов, проникающих в центральную нервную систему (ЦНС), что характерно для вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

Цель работы: оценить возможность образования на основе самореплицирующихся РНК (срРНК), продуцирующих целевые антигены лентивируса на платформе альфавирусного репликона (вирус Синдбис или вирус венесуэльского энцефаломиелиита лошадей), рекомбинантных вирусоподобных частиц (рекВПЧ) ВИЧ-1В и рекВПЧ ВИЧ-1В и вируса иммунодефицита обезьян (SHIV_{89.6P}), а также их способность инфицировать клетки глиобластомы и макрофаги человека.

Материалы и методы. Клетки почки новорождённого хомяка (ВНК-21) трансфицировали срРНК с помощью электропорации; рекВПЧ в инфицированных клетках выявляли с помощью микроиммунофлуоресцентного анализа и электронной микроскопии и использовали для заражения клеток глиобластомы и макрофагов человека.

Результаты. На основе геномной РНК альфавируса созданы плазмиды, позволяющие получить срРНК, экспрессирующие в клетках продукты генов лентивирусов в количестве, достаточном для формирования зрелых рекВПЧ. В клетках ВНК-21, трансфицированных срРНК, вирусспецифичные антигены выявляются только в цитоплазме клеток. Клетки глиобластомы (U87), содержащие рецептор CD4 и корецепторы CCR5 и CXR4, а также макрофаги человека дают инфекционное потомство рекВПЧ ВИЧ-1В и SHIV_{89.6P} при инфицировании супернатантом, полученным после трансфекции срРНК клеток ВНК-21.

Заключение. Полученные результаты показывают возможность экспрессии структурных белков лентивируса в клетках глиобластомы (U87) и в макрофагах человека и могут быть использованы в дальнейшем для изучения презентации антигенов в нативной и функциональной конформации в соответствующих модельных системах для исследования возможности подавления инфекции ВИЧ в резервуарах вируса в ЦНС.

Ключевые слова: самореплицирующиеся ВПЧ, лентивирусы, центральная нервная система, вирус венесуэльского энцефаломиелиита лошадей, нейроинвазивность

Благодарность. Авторы выражают благодарность Московскому предприятию по производству бактериальных препаратов (Москва, Россия) — С.Б. Алексееву и И.З. Зайцеву за помощь, поддержку, советы, научное руководство и финансирование начальной фазы разработки; лаборатории Р.Е. Джонстона факультета микробиологии и иммунологии Университета Северной Каролины (Чепел Хил, США) — профессорам Нэнси Дэвис и Роберту Джонстону за помощь, поддержку, советы и научное сотрудничество; лаборатории М.С. Сальвато и Институту вирусологии Медицинской Школы Университета штата Мэриленд (Балтимор, США) — профессорам Марии Сальвато и Роберту Галло за помощь, поддержку, советы и научное сотрудничество; профессору Чарльзу Райсу за предоставленный репликон SinRep5, поддержку и научное сотрудничество.

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: Мошков Г.Д., Мошков А.Е., Мошков Д.А. Самореплицирующиеся рекомбинантные вирусоподобные частицы лентивирусов, размножающиеся в клетках глиобластомы и макрофагах человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):650–660.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-505>

EDN: <https://www.elibrary.ru/qvхера>

Self-replicating recombinant virus-like particles of lentivirus proliferating in glioblastoma cells and normal human macrophages

Herman D. Moshkoff¹, Andrey E. Moshkoff^{2,3}, Dmitry A. Moshkoff^{1,2,3}✉

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

²US Pharma Biotechnology Inc., Baltimore, USA;

³Global Virus Network, Baltimore, USA

Abstract

Introduction. Both attenuated and inactivated vaccines are used in disease control. Inactivated vaccines are very diverse and include whole cell and acellular vaccines containing protein target antigens or nucleic acids encoding target antigens. Immunity induced by inactivated vaccines is not believed to be long-lasting. It is very problematic to develop a vaccine against viruses that integrate into the genome of the host cell, as well as against persistent viruses that penetrate the central nervous system (CNS), which is typical for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1).

Aim of the study: to evaluate the possibility of forming HIV-1 recombinant virus-like particles (recVLPs) and HIV-1B recombinant VLPs and simian immunodeficiency virus (SIV) — SHIV_{89.6P} based on self-replicating RNAs (srRNAs) producing target lentivirus antigens on the alphavirus replicon platform (Sindbis virus or Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEEV)), and also to evaluate the ability of HIV-1B and SHIV_{89.6P} VLPs to infect glioblastoma cells and normal human macrophages.

Materials and methods. BHK-21 cells were transfected with the srRNA mixture by electroporation. Recombinant virus-like particles (recVLP's) in recVLP's-infected cells were detected using the immunofluorescence assay (ELISA) and electron microscopy. recVLP's were used to infect glioblastoma cells and normal macrophages from a healthy donor.

Results. Based on the genomic RNA of the alphavirus, the plasmids were created, transcription from which makes it possible to obtain RNA that expresses lentiviral gene products in cells in quantities sufficient for the formation of mature VLPs. In BHK-21 cells infected with recVLP's, virus-specific antigens are detected only in the cytoplasm, but not in the nucleus. Both glioblastoma cells (U87) and normal human macrophages containing CD4 receptor and SSR5 and CXR4 co-receptors give infectious progeny of HIV-1B and SHIV_{89.6P} recVLP's when infected with supernatant obtained after transfection of BHK-21 cells with srRNA.

Discussion. The results obtained show the possibility of expressing lentivirus structural proteins in glioblastoma cells (U87) and in normal human macrophages and can be used in the future to study the presentation of antigens in native and functional conformations in appropriate model systems to study the possibility of suppressing HIV infection in viral reservoirs in the CNS.

Keywords: self-replicating VLPs, lentiviruses, CNS, VEEV, neuroinvasiveness

Acknowledgement. The authors would like to thank S.B. Alexeev and I.Z. Zaitsev of the Moscow Bacterial Drug Enterprise (Moscow, Russia) for their support, advice, scientific guidance and funding for the initial phase of development; the laboratory of R.E. Johnston of the Department of Microbiology and Immunology, University of North Carolina (Chapel Hill, USA) – Professors Nancy Davis and Robert Johnston for their support, advice and scientific cooperation; the laboratory of M.S. Salvato Laboratory and the Institute of Virology, University of Maryland School of Medicine (Baltimore, MD, USA) to Professors Maria Salvato and Robert Gallo for their support, advice and scientific cooperation; to Professor Charles Rice for providing the SinRep5 replicon, support and scientific cooperation.

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: Moshkoff H.D., Moshkoff A.E., Moshkoff D.A. Self-replicating recombinant virus-like particles of lentivirus proliferating in glioblastoma cells and normal human macrophages. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):650–660.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-505>

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

Введение

Несмотря на введение антиретровирусной терапии в 1996 г., около половины пациентов с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) демонстриру-

ют когнитивные нарушения, известные как ВИЧ-ассоциированные нейрокогнитивные расстройства (HAND). По современным оценкам, HAND выявляется у 50% людей с длительно существующей

ВИЧ-инфекцией^{1,2}. Механизмы HAND, связанные с ВИЧ типа 1 (ВИЧ-1), не ясны. Центральная нервная система (ЦНС) сильно компартментализирована и служит специфическим местом инфекции ВИЧ-1. Репликация ВИЧ-1 в ЦНС сохраняется, несмотря на длительную комбинированную антиретровирусную терапию, из-за неспособности современных антиретровирусных препаратов проникать и преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [1]. В результате устойчивой репликации ВИЧ-1 в ЦНС даже на фоне комбинированной антиретровирусной терапии наблюдается высокая частота HAND [2, 3].

С другой стороны, при анализе пандемии COVID-19 появляется всё больше доказательств того, что SARS-CoV-2 влияет не только на дыхательные пути, но и на ЦНС, что приводит к неврологическим симптомам, таким как потеря обоняния и вкуса, головная боль, усталость, тошнота и рвота, которые наблюдаются у более чем трети людей с COVID-19 [4, 5]; отмечены острые цереброваскулярные симптомы и сообщалось о нарушениях сознания [6]. Два штамма эндемичного SARS-CoV-2 проникают и персистируют в ЦНС, и вирусная РНК была выявлена в головном мозге и спинномозговой жидкости [7–10].

Таким образом, как ВИЧ-1, так и SARS-CoV-2 можно отнести к пантропным вирусам, нейротропность которых может быть обусловлена как офтальмологическим и клеточными путями проникновения в ЦНС, так и другими, пока не выявленными механизмами [11].

Нами ещё в 1990-е гг. было предложено использовать для создания вакцин против таких пантропных вирусов векторные вирусные системы, утратившие нейровирулентность, но сохранившие нейроинвазивность. Проведённый анализ привёл нас к выводу, что наиболее пригодны для этого вакцинные штаммы TC-83 и 15 вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (VEEV). Модельные эксперименты подтвердили, что использование вакцинного штамма с такими характеристиками защищает животных даже от внутримозгового заражения вирулентным штаммом [12–14].

В 1998 г. нами была показана возможность иммунизации модельных животных при введении самореплицирующейся РНК (срРНК) вируса Синд-

бис, несущей гены *env* и *gag* ВИЧ-1В³, что было подтверждено А.Д. Геал и соавт. в 2012 г. при использовании срРНК VEEV [15].

В 2000–2003 гг. в рамках программы Международной организации по борьбе со СПИДом, Инициативы по вакцинам, Сотрудничества по разработке вакцины против СПИДа Национального института изучения аллергических и инфекционных заболеваний Национального института здоровья США нами были созданы плазмиды репликона VEEV, экспрессирующие белки Gag/Pol и белок Env (gp160) SHIV^{89,6P}. Полученные плазмиды затем были использованы для изучения влияния быстрой деградации на экспрессию части Gag SIV в одноцикловом векторе. Установлено, что вирусоподобные частички (ВПЧ) VEEV, не способные к саморепликации, эффективнее представляют целевой антиген в том случае, когда рекомбинантный репликон упакован в ВПЧ, несущие шипы гликопротеина дикого типа VEEV [16].

Позднее С.К. Jurgens и соавт., используя созданные Д.А. Мошковым плазмиды репликона VEEV, экспрессирующие антигены SHIV^{89,6P} Gag и SHIV^{89,6P} Env (gp160), провели изучение экспрессии этих белков в клетках обезьян [17]. Они установили, что экспрессия белков Gag и Env на платформе РНК VEEV в клетках приматов привела к сборке частиц, которые морфологически и функционально напоминали вирионы лентивирусов и включали репликон альфавируса. Инфицирование CD4⁺-клеток химерными лентивирусоподобными частицами было специфичным и продуктивным, что приводило к репликации РНК, экспрессии Gag и Env и образованию дочерних химерных частиц. Дальнейшие модификации генома, направленные на усиление инкапсидации генома химерного вируса и экспрессию аттенуированной протеазы вируса иммунодефицита обезьян (SIV) для созревания частиц, улучшили способность химерных лентивирусоподобных частиц размножаться в клеточной культуре. Показана возможность презентации иммуногенов лентивируса в нативной и функциональной конформации [17].

В обзоре, проведённом сотрудниками 48-го Центрального научно-исследовательского института Министерства обороны РФ, рассмотрено применение альфавирусных векторов для разработки вакцин против широкого круга вирусов [18]. Подчёркивается, что РНК-репликоны альфавирусов сочетают безопасность инактивированных и иммуногенность живых аттенуированных вакцин. Такие конструкции пригодны для экспрессивной разработки вакцин с целью специфической профилактики вирусных инфекционных заболеваний, и наличие

¹ Wenzel E.D. Mechanism of hiv-1 gp120 neurotoxicity: the role of microtubules. A Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of Arts and Sciences of Georgetown University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Pharmacology. Washington; 2019.

² Smith L.K. Role of neurotropism in hiv-1 gp120 induced oxidative stress and neurodegeneration. A Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry and Neuroscience. Fairbanks; 2020.

³ Мошков Д.А. Клонирование и экспрессия генов *GAG* и *ENV* вируса иммунодефицита человека в векторных системах на основе генома вируса Синдбис: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15. М.; 1998.

пригодного для иммунизации человека штамма TC-83 VEEV определяет перспективы создания РНК-репликона на основе генома этого возбудителя [18]. Казахскими исследователями ген зелёного флуоресцирующего белка встроен в геном VEEV под контроль синтетической копии вирусного промотора 26S субгеномной РНК. РНК-транскрипт рекомбинантного вируса трансфицирован в культуру клеток почки новорождённого хомяка (ВНК-21). К 36 ч после трансфекции почти все клетки в культуре демонстрировали яркую флуоресценцию маркерного белка [19]. Таким образом, данные, полученные в последние 3 десятилетия, подтверждают перспективность выбранного нами направления.

Цель данной работы — оценить возможность образования на основе срРНК, продуцирующих целевые антигены лентивируса на платформе альфавирусного репликона, ВПЧ ВИЧ-1В и ВПЧ рекомбинанта ВИЧ-1В и SHIV^{89.6P} а также способность ВПЧ ВИЧ-1В и SHIV^{89.6P} инфицировать клетки глиобластомы и макрофаги человека.

Материалы и методы

Плазмиды, экспрессирующие РНК репликона VEEV и химерные вирусные геномы

Плазмиды рекомбинантного репликона VEEV, полученные Д.А. Мошковым и применённые в исследованиях ранее, описаны в соответствующих работах [16, 17], схематическое изображение плазмид представлено на **рис. 1**.

Наработка и титрование частиц репликона

Линеаризованные плазмиды, кодирующие целевые белки, служили матрицей для синтеза кэпи-

рованных РНК с использованием набора «mMessage Machine T7» («Ambion»). Субконфлюэнтные (80%) клетки собирали и готовили для электропорации. Клетки осаждали центрифугированием при 800g в течение 10 мин, промывали фосфатным буферным раствором, не содержащим рибонуклеазы, и ресуспендировали до концентрации $1,5 \times 10^7$ клеток/мл в фосфатном буферном растворе, не содержащем рибонуклеазы.

Синтезированной *in vitro* срРНК (1 мкг) трансфицировали клетки ВНК-21 с помощью электропорации с использованием «BioRAD GenePulser» («Bio-Rad»). Клетки трижды подвергали импульсному воздействию при напряжении 850 В и ёмкости 25 мкФ.

Сбор и очистку рекомбинантных ВПЧ (рекВПЧ) проводили путём осаждения через подушку из раствора сахарозы.

РекВПЧ титровали путём инфицирования клеток глиобластомы U87.CD4-CCR5 и U87.CD4-CXCR4 серийными разведениями очищенных рекВПЧ в течение 16 ч при 37°C с последующей 10-минутной фиксацией метанолом при 4°C. Фиксированные клетки регидратировали в фосфатно-солевом буфере pH 7,2 и инкубировали с соответствующей антисывороткой в разведении 1 : 100 в течение 1 ч при комнатной температуре. Антисыворотки к белкам лентивирусов получили от доктора D.C. Montefiore по программе получения реагентов по СПИД (отдел СПИД, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health). Оценка этих нейтрализующих антител против ВИЧ, SIV и SHIV приведена в работе [20]. Клетки промывали и инкубировали с биотинилированным антимышиным IgG, затем со стрептави-

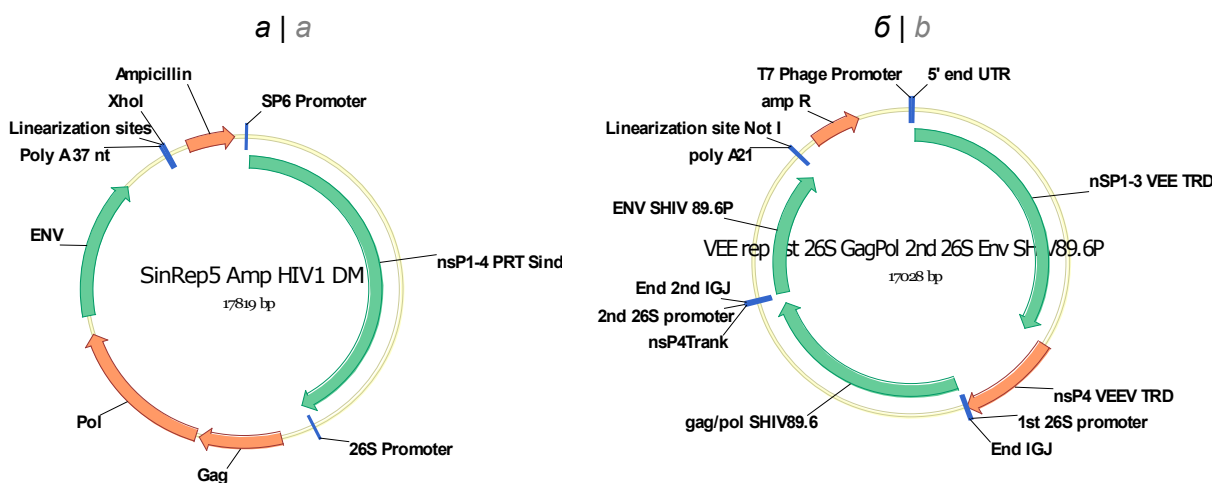


Рис. 1. Схематическое изображение плазмид, транскрибированная РНК с которых ведёт к трансляции белков, способных образовывать ВПЧ.

a — на платформе репликона вируса Синдбис; б — на платформе репликона VEEV.

Fig. 1. Schematic representation of plasmids, transcribed RNA from which leads to translation of proteins capable of forming VLPs.

a — on the Sindbis virus replicon platform; b — on the VEEV replicon platform.

дином, конъюгированным с Alexaflour Texas Red. Заражённые рекВПЧ клетки оценивали под микроскопом по флуоресценции при ультрафиолетовом освещении.

Клетки

Все клетки получали по программе получения реагентов по СПИД (отдел СПИД, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health).

Клетки ВНК-21 поддерживали в минимально необходимой среде альфа, дополненной 10% фосфатно-солевым буфером, 2 мМ L-глутамина и 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина при 37°C в CO₂-инкубаторе [17].

Клетки U87, стабильно экспрессирующие CD4 и корцептор CCR5 дикого типа (U87.CD4⁺CCR5⁺ и U87.CD4⁺X4⁺), культивировали в модифицированной среде Дульбекко по Искову («Termo Fischer Scientific») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и пенициллин/стрептомицина (10 мкг/мл) [21].

Коммерческие культуры макрофагов получали из CD14⁺-моноцитов периферической крови человека (чистота > 90%). Макрофаги культивированы из моноцитов в среде, содержащей rhM-CSF, в течение нескольких дней и готовы к использованию. Человеческие макрофаги были изолированы у здорового взрослого донора. Макрофаги характеризуются использованием антител, специфичных к CD14, CD11b. Коммерческие макрофаги отрицательны на ВИЧ-1, вирус гепатита В и С, микоплазму, бактерии, дрожжи и грибы.

Микроиммунофлуоресцентный анализ

Для мониторинга трансфекции (электропорации) и определения титра рекВПЧ с помощью микроиммунофлуоресцентного анализа клеток ВНК₂₁ выращивали на 4- или 8-луночных предметных стеклах «LabTek» («Nalge Nunc International») в CO₂-инкубаторе при 37°C. Через 24 ч после заражения предметные стекла фиксировали в ацетон-метаноле (1 : 1) при 4°C не менее 1 ч. При исследовании трансфицированных клеток высевали примерно 10⁵ электропорированных клеток высевали на 4- или 8-луночные предметные стекла, инкубировали и фиксировали, как описано выше. Фиксированные клетки регидратировали в фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,2 и инкубировали с разведением 1 : 100 соответствующими антисыворотками к Gag и Env, полученными от доктора D.C. Montefiore, в течение 1 ч при комнатной температуре, а также с мышинными анти-ВИЧ p17 моноклональными антителами и сывороткой от ВИЧ⁺-пациента. После 3 промываний в фосфатно-солевом буфере добавляли конъюгат козьего античеловеческого или козьего антимышиного IgG-изотиоцианата флуоресцеина

(«Sigma») в разведении 1 : 100, предметное стекло инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с последующими 3 дополнительными промывками. Слайды исследовали и фотографировали под конфокальным флуоресцентным микроскопом «Zeiss LSM110» («Carl Zeiss SMT, Inc.»). Изображения были оцифрованы и проанализированы с помощью программы «Photoshop» («Adobe Systems Inc.»).

Электронная микроскопия

Клеточные монослои кратковременно промывали бессывороточной средой и фиксировали 4% глутаральдегидом в 0,15 М натрия фосфатном буфере pH 7,4 в течение ночи. Следующие 3 промывания делали фосфатным буфером и фиксировали монослои в течение 1 ч в смеси 1% OsO₄ и 1,25% феррицианида калия в 0,15 М натрий-фосфатном буфере. Далее клетки промывали деионизированной водой и обезвоживали за счёт увеличения концентрации этанола (30, 50, 75 и 100%, по 5 мин каждый). Клетки были инфильтрированы двумя концентрациями эпоксидной смолы Polybed 812 (состав 1А : 2В, «Polysciences, Inc.») в течение нескольких часов при каждой смене, полимеризовали в течение 24 ч при 60°C в формах для заливки, где их отделяли от пластин перед секционированием. Ультратонкие срезы (70 нм) были вырезаны алмазным ножом Diatome; секции монтировали на медные сетки (200 ячеек) и окрашивали 4% водным раствором уранилацетата в течение 15 мин, затем цитратом свинца Рейнольдса в течение 7 мин. Срезы были сфотографированы с помощью просвечивающего электронного микроскопа «LEO EM910» («Carl Zeiss SMT, Inc.») при 80 кВ.

Результаты

В конструкции прототипа химерной вирусной вакцины использован неполный геном РНК альфа-вируса (Синдбис или VEEV), содержащий гены *gag/pol* и *env*, экспрессирующие соответствующие белки лентивируса. Электропорация клеток трансрибированными с этих плазмид срРНК приводит к самосборке лентивирусоподобных частиц.

Последовательности ДНК, кодирующие белки Gag/Pol и Env gp160 лентивирусов (HIV-1В и SHIV_{89,6P}) были получены стандартными методами геной инженерии. Плазмида, содержащая ДНК, кодирующую белки HIV-1В, сконструирована на платформе реплика вируса Синдбис (рис. 1, а). Плазмида, содержащая ДНК, кодирующую белки SHIV_{89,6P} на платформе реплика VEEV, сконструирована из молекулярного клона SHIV_{89,6P} KB9 (GenBank # U89134) (рис. 1, б).

У плазмиды SHIV_{89,6P} 5'-праймер содержал субгеномные промоторные последовательности 26S, а 3'-праймер — стоп-кодон и сайт AscI для кло-

нирования в плазмиду репликона VEEV. С-конец последовательностей промотора NSP4 и 26S амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и использовали в ПЦР с перекрывающимся удлинением с фрагментом, содержащим структурные гены с промотором 26S репликона для проведения ПЦР. Фрагмент, содержащий С-конец NSP4, полный субгеномный промотор VEEV 26S, структурный ген *SHIV_{89,6P}* и сайт рестрикции AscI, внедряли в вектор ПЦР-клонирования Zero Blunt («Invitrogen») и определяли последовательность нуклеотидов. Фрагмент 26S-Gag лигировали с pVR100 *SHIV_{89,6P}* Env. Фрагмент 26S-Env лигировали с pVR21 *SHIV_{89,6P}* Gag. Положительные клоны идентифицировали с помощью рестрикционного анализа и идентифицировали секвенированием. Более полное получение этих плазмид и их дальнейшая модификация описаны ранее [16, 17].

Транскрибированными с синтезированных плазмид рекомбинантными срРНК (по 1 мкг), экспрессирующими структурные белки альфавирусов, трансфицировали клетки ВНК₂₁. Полученные ВПЧ исследовали с помощью электронной микроскопии. Обнаружено, что трансфекция клеток как рекРНК вируса Синдбис (экспрессия структурных белков ВИЧ-1В), так и рекРНК VEEV (экспрессия структурных белков *SHIV_{89,6P}*) приводит к формированию ВПЧ. Титры получаемых на платформе VEEV рекВПЧ составляли 10^5 – 10^6 инфекционных единиц на 1 мл, что совпадает с данными других авторов, использовавших полученные нами плазмиды [17].

Таким образом, нами были созданы конструкции, экспрессирующие продукты генов *HIV_{1B}* и *SHIV_{89,6P}* в количестве, достаточном для формирования зрелых рекВПЧ (рис. 2).

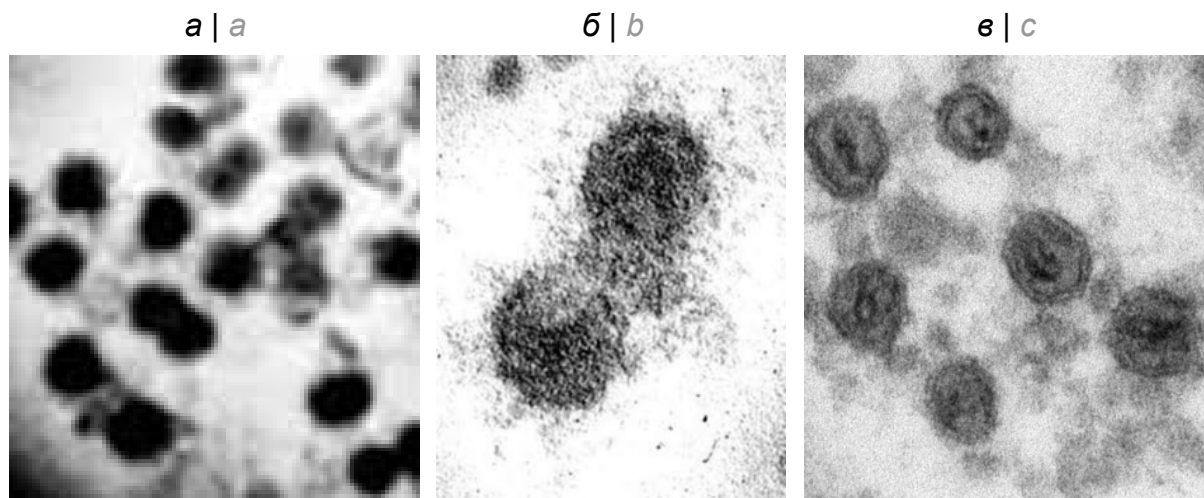


Рис. 2. Электронно-микроскопические фотографии лентивирусных ВПЧ.

а и б — ВПЧ ВИЧ-1В; в — ВПЧ *SHIV_{89,6P}*

Fig. 2. Electron microscopic photographs of lentiviral VLPs.

a and b — HIV-1B VLPs; c — VLP *SHIV_{89,6P}* VLPs.

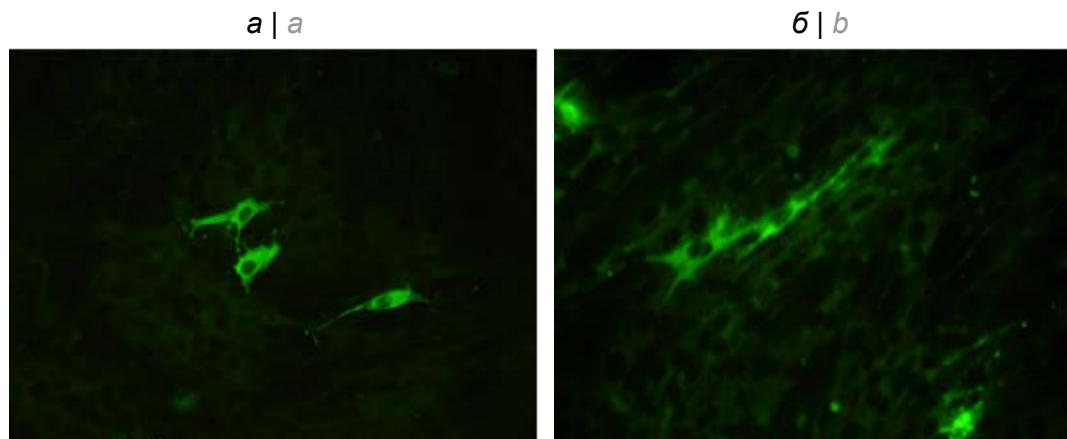


Рис. 3. ИФА, репликация срРНК в цитоплазме клеток ВНК-21 и экспрессия белков гена *gag* (а) и гена *env* (б) *SHIV_{89,6P}*
Fig. 3. ELISA, srRNA replication in the cytoplasm of BHK-21 cells and protein expression of the *gag* gene (a) and *env* gene (b) of *SHIV_{89,6P}*



Рис. 4. Образование синцития на макрофагах человека, инфицированных рекВПЧ лентивирусов. *a* — негативный контроль, $\times 20$; *б, в* — сформированный синцитий, $\times 40$: рекВПЧ ВИЧ-1В (*б*) и рекВПЧ SHIV_{89.6P} (*в*).

Fig. 4. Formation of syncytium on human macrophages infected with lentivirus recVLPs. *a* — negative control, $\times 20$; *b, c* — formed syncytium, $\times 40$: HIV-1B recVLPs (*b*) and SHIV_{89.6P} recVLPs (*c*).

При микроиммунофлуоресцентном анализе структурные белки SHIV_{89.6P} выявлены только в цитоплазме трансфицированных клеток (**рис. 3**). Титры рекВПЧ составляли 10^4 – 10^6 инфекционных единиц на 1 мл.

CCR5 и CXCR4 являются двумя основными корецепторами, необходимыми для проникновения ВИЧ. Клетки глиобластомы линии *U87.CD4.CCR5* и *U87.CD4.CXCR4* надёжно поддерживают инфекцию ВИЧ-1 различных адаптированных к лабораторным условиям штаммов и первичных изолятов с различным использованием корецепторов (R5, X4 и R5/X4), что позволяет исследовать противовирусную эффективность комбинированной CCR5 и CXCR4 блокады антагонистами [22].

Заражение этих линий клеток U87 с рецептором CD4 и корецепторами CCR5 и X4 и макрофагов человека химерными лентивирусоподобными частицами было специфичным и продуктивным и привело к репликации срРНК, экспрессии и процессингу продуктов генов *gag/pol* и *env* ВИЧ-1В, и SHIV_{89.6P} и генерации дочерних химерных частиц рекВПЧ, способных давать инфекционное потомство. Заражение макрофагов человека приводило к формированию синцития как при инфицировании рекВПЧ ВИЧ-1В, так и при инфицировании рекВПЧ SHIV_{89.6P} (**рис. 4**).

Таким образом, самовоспроизводящиеся ВПЧ лентивирусов способны реплицироваться в клетках глиобластомы и вызывать слияние нормальных макрофагов человека.

Обсуждение

Работы по созданию вакцин против ВИЧ ведутся более 30 лет, однако, несмотря на определённые достижения, особого успеха не достигнуто. Одной из причин является создание резервуара ускользающих от иммунитета вариантов ВИЧ в ЦНС. Решением этой проблемы могло бы быть применение

аттенуированных альфавирусных векторов с утраченной нейровирулентностью, но сохранённой нейроинвазивностью [12, 13, 23].

Нами были сконструированы плазмиды, которые позволяют транскрибировать срРНК, трансфекция которыми клеток позволяет не только экспрессировать целевые белки, но и приводит к формированию инфекционных рекВПЧ. Эти рекВПЧ, по-видимому, могут представлять антиген клеткам иммунной системы в конформациях, близких к нативным [24–26]. При попадании в клетку срРНК происходит репликация, и срРНК упаковывается в такие химерные частицы. Когда геном репликаона затем высвобождается в цитоплазму после проникновения химерных частиц в восприимчивые клетки, химерные частицы потенциально могут воспроизводиться и функционировать как живая вирусная вакцина. Используя созданные конструкции, показали, что экспрессия генов *gag* и *env* рекомбинантной РНК VEEV в клетках приматов приводила к сборке частиц, которые морфологически и функционально были ВПЧ лентивируса и включали рекомбинантную альфавирусную РНК, обеспечивающую самосборку ВПЧ. Таким образом, рекВПЧ с оболочкой ВИЧ-1В и SHIV_{89.6P} по сути являются рекомбинантными вирусами, что может помочь обойти сложности, обычно присущие неинфекционным ВПЧ.

Заражение клеток с рецептором CD4 и корецепторами CCR5 и X4 химерными лентивирусоподобными частицами было специфичным и продуктивным и приводило к репликации РНК, экспрессии и процессингу продуктов генов *gag/pol* и *env* ВИЧ и генерации дочерних химерных частиц. Дальнейшие модификации плазмид, кодирующих белки SHIV_{89.6P} (**рис. 1, в**), проведённые другими исследователями и направленные на усиление инкапсуляции генома химерного вируса и экспрессии протеазы SHIV_{89.6P} для созревания частиц, улучшали способность

химерных лентивирусоподобных частиц размножаться в клеточной культуре [17].

Проведённые здесь и ранее исследования привели к получению РНК, способных к самовоспроизведению, и при трансфекции этими РНК формируются рекВПЧ. Экспрессия этими рекВПЧ антигенов лентивирусов наблюдается только в цитоплазме. Поскольку отсутствует интеграция в геном хозяина, вакцинация такими ВПЧ не должна приводить к персистирующей или хронической инфекции. Альфа-вирусы чувствительны к интерферону. Поэтому для повышения чувствительности к интерферону в геном можно встроить аттенуирующие мутации [22, 23]. Вакцинный штамм VEEV, разрешённый для применения в группах риска, способен проникать в ЦНС модельных животных через ГЭБ [12, 13, 27]. По нашему мнению, данные, представленные в настоящей работе и полученные ранее, а также проведённый анализ опубликованных работ позволяют считать, что дальнейшие исследования по совершенствованию такого рода вакцины оправданны и должны включать, прежде всего, применение адекватных животных моделей, изучение напряжённости индуцируемого иммунитета и оценку безопасности таких вакцин.

При наработке срРНК этап получения вирусного потомства для последующей иммунизации не требуется. Это, по-видимому, позволит использовать мукозальный или внутрикожный (ID) способы иммунизации, более эффективные, экономные и иммуногенные по сравнению с внутримышечной инфекцией [28–30].

Выполненная работа и данные авторов, использовавших созданные Д.А. Мошковым плазмиды [17], обеспечивают доказательство возможности созданных нами химерных конструкций экспрессировать структурные белки лентивируса и собираться в инфекционные частицы для презентации иммуногенов лентивируса в их нативной и функциональной конформации.

ВИЧ может проникать в ЦНС, заражая иммунокомпетентные клетки, которые способны преодолевать ГЭБ. Таким образом, ВИЧ может маскироваться, обходя биологический барьер, который ограничивает проникновение большинства других чужеродных молекул. Антитретровирусные препараты, как правило, не способны эффективно проникать через ГЭБ или быстро выводятся из паренхимы головного мозга, что приводит к неэффективной элиминации ВИЧ из головного мозга и образованию резервуаров вируса. В мозге существуют гетерогенные клеточные резервуары, способные содержать покоящийся ВИЧ. Такое накопление в ЦНС может привести к отскоку вируса и рецидиву инфекции. Налицо парадокс, заключающийся в том, что чужеродные вирусные компоненты пересекают ГЭБ и передаются в ЦНС, в то

время как важнейшие терапевтические препараты не могут туда проникнуть [3].

Как у нечеловекообразных приматов, так и у кошек из ткани ЦНС или из спинномозговой жидкости выделены нейровирулентные варианты [31, 32], вызывающие более быстрое нарушение поведенческих реакций и ускоренную гибель. Выделение и клонирование вариантов лентивирусов, вызывающих гибель животных в короткие сроки, открывает возможность быстрой проверки эффективности защитных препаратов. Изолят SIVsmmPBj14 (SIV-PBj14) является одним из наиболее вирулентных известных лентивирусов приматов: он вызывает острое заболевание и смерть в течение 6–10 дней после внутривенной инокуляции свинохвостым макаком [33, 34]. SIV-PBj14 реплицировался более эффективно, чем исходный пул вируса в мононуклеарных клетках периферической крови (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) человека, а также реплицировался в PBMC шимпанзе. Нормальные PBMC макака, инфицированные *in vitro* SIV-PBj14, образовывали синцитии с Т-лимфоцитами из лимфомы человека (Sup-T1), тогда как исходный пул вируса не приводил к образованию синцитий с этими клетками [36]. Инфекция ВПЧ SHIV^{89.6P} нормальных макрофагов также приводила к образованию синцитий, что, по нашему мнению, является положительным свойством при дальнейшей разработке вакцины, способной к подавлению ВИЧ-нейроинфекции.

Повышенная реактогенность штамма ТС-83, обычно рассматриваемая как нежелательный признак [35], в случае борьбы с неизбежным проникновением ВИЧ в ЦНС будет, по-видимому, являться положительным свойством. Уместно напомнить ситуацию с фиксированным вирусом бешенства, когда высокое и быстрое накопление вируса в ЦНС и разрушение нейронов, которое не наблюдается при инфекции грызунов диким штаммом, включает воспалительный и иммунный ответы, что ведёт к созданию выраженной и надёжной защиты [36]. Целью проведённых в США исследований, по-видимому, было получение аттенуированных вариантов VEEV, утративших способность передаваться комарам и пригодных для иммунизации лошадей, а также неспособных ревертировать к дикому типу [37], т. к. периодические вспышки VEEV приводили к гибели десятков тысяч лошадей [38]. Введение дополнительных аттенуирующих мутаций в штамм ТС-83 VEEV привело к получению вариантов со сниженным цитопатическим действием. Виремия у взрослых мышей не выявлялась, а виремия у мышей-сосунков, если и обнаруживалась, то была низкого уровня. Невозможность вызвать виремию отрицательно сказывалась на титрах, индуцированных нейтрализующих антител. Они стали в 10 раз ниже, чем при иммунизации штаммом ТС-83. Когда мутировавший белок нуклеокапсида был помещён

под контроль участка внутренней посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита мышей, то хотя вариант стал менее вирулентен для мышей-сосунков, он был менее эффективен в индукции нейтрализующих антител. Он не вызывал виремию и не проникал в мозг взрослых мышей [40]. Инактивированная вакцина на основе высокоаттенуированного штамма ТС-83 230 не защищала животных от аэрогенного заражения, при котором вирулентные штаммы легко проникают в мозг. В то же время штамм, аналогичный по характеристикам штамму ТС-83 (с утраченной нейровирулентностью, но сохранённой нейроинвазивностью), защищал даже от внутримозгового заражения энцефалитогенным штаммом VEEV [12]. Вывод о том, что для опережающей защиты ЦНС целесообразно использовать векторы на платформе VEEV и что для создания вакцины-кандидата наиболее пригоден штамм ТС-83 [1], по-видимому, справедлив и в настоящее время. Целесообразность применения репликона VEEV для создания эффективных кандидатов вакцин против ряда вирусов достаточно полно рассмотрена в обзоре А.А. Петрова и соавт. [18].

Авторы статьи осознают сложности стоящей проблемы — как у любой новой технологии, использование срРНК имеет свои плюсы и минусы. В опубликованном в 2021 г. обзоре [39] А.В. Благов и соавт. справедливо отмечают, что главным преимуществом РНК-вакцин является скорость их разработки и производства. Тем более что появляются новые эффективные методы бесклеточного синтеза кольцевой ДНК. Минимизация использования живых бактериальных культур и вирусов в производстве вакцин позволяет снизить риски контаминации и сделать производство ещё более быстрым и безопасным. Авторы обзора также указывают, что нестабильность РНК может быть как недостатком из-за опасности деградации молекулы и развития слишком сильной воспалительной реакции, так и преимуществом из-за того, что сама мРНК может выполнять роль адьюванта. Нестабильность также влияет на режим хранения мРНК-вакцин (от -80°C до -20°C), вынуждая поддерживать холодовую цепь или применять липидные наночастицы для повышения термостабильности мРНК-вакцин [39]. Метод получения описанных в этом исследовании срРНК, по-видимому, может быть масштабируем, а сами рекВПЧ нарабатываются и в клетках грызунов, и в клетках приматов и характеризуются высокой иммуногенностью. рекВПЧ на платформе VEEV хорошо охарактеризованы как качественно, так и количественно, более того, показана их эффективность против высоковирулентного для обезьян штамма SIV [16, 17, 40].

В настоящее время, по-видимому, созданы условия для проведения исследований, позволяющих изучить возможность создания эффективной

вакцины против ВИЧ, ускользающего от иммунитета в резервуарах ЦНС. На промежуточной стадии исследований конструкции, разработанные казахскими исследователями на базе вакцинного штамма ТС-83 VEEV [19], можно применить для подкожного заражения модельных животных (мыши или кролики). Если этот рекомбинантный вирус сохранил способность проникать через ГЭБ, то в мозге инфицированных животных, по-видимому, будет экспрессироваться зелёный флуоресцирующий белок. Поскольку самореплицирующиеся ВПЧ способны инфицировать и клетки ЦНС (глиообластома), и макрофаги, то целесообразно внедрить в конструкцию флуоресцирующий маркерный белок и изучить его экспрессию в составе рекВПЧ SHIV_{89,6P} в ЦНС обезьян. В случае экспрессии маркерного белка можно будет перейти к заключительной стадии проверки эффективности рекВПЧ, экспрессирующих белки Env и Gag, на модели SIV — приматы или на модели кошки — вариант вируса иммунодефицита кошек, вызывающий быструю гибель животных.

Таким образом, полученные нами и другими исследователями результаты позволяют получать рекВПЧ. Эти ВПЧ индуцируют наработку антигенов в клетках обезьян [17], способны реплицироваться в клетках ЦНС человека и вызывают образование синцития у макрофагов человека. В данной работе с срРНК идет синтез лентивирусных белков и рекРНК, которые формируют полноценные вирусные частицы, способные заражать чувствительную клеточную линию и давать потомство вирионов. Поэтому получаемые таким образом ВПЧ корректнее называть рекВПЧ. Ещё раз обращаем внимание на то, что рекВПЧ инфицируют макрофаги человека, а значит, появляется система, способная как доставить целевые антигены в ЦНС, так и представлять их иммунокомпетентным клеткам.

Всё это позволяет считать, что возможно представление в ЦНС антигенов в нативной и функциональной конформации. Поэтому можно говорить о целесообразности применения подобных конструкций в дальнейших исследованиях, направленных на получение вакцины кандидата для подавления ВИЧ в резервуарах ЦНС.

Данная работа является частью исследований по созданию вакцины против ВИЧ, способной элиминировать вирус из ЦНС. Естественно, что дальнейшие работы следует проводить в условиях повышенной биологической защиты.

Выводы

1. На платформе репликона альфавирусов сконструированы плазмиды, содержащие гены, кодирующие белки Gag и Env ВИЧ (репликон вируса Синдбис) и белки Gag и Env рекомбинанта SIV и ВИЧ-1B SHIV_{89,6P} (репликон VEEV).

2. РНК, транскрибируемая с этих плазмид, при трансфекции клеток приводит к образованию ВПЧ.

3. РекВПЧ SHIV^{89,6P} способны инфицировать клетки ЦНС человека (линии U87.CD4⁺CCR5⁺ и U87.CD4⁺X4⁺ глиобластомы) и макрофаги здорового донора.

4. При инфекции макрофагов человека рекВПЧ SHIV^{89,6P} наблюдается образование синцития.

5. Данные, полученные при изучении рекВПЧ SHIV^{89,6P} авторами и другими исследователями, свидетельствуют о том, что презентация иммуногенов лентивируса возможна в нативной и функциональной конформации (индукция специфических антител, связывание с соответствующими рецепторами на клетках ЦНС, образование синцития у макрофагов), и поддерживают целесообразность применения подобных конструкций при дальнейших разработках по созданию вакцины для подавления ВИЧ в резервуарах ЦНС.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Moretti S., Virtuoso S., Sernicola L., et al. Advances in SIV/SHIV non-human primate models of NeuroAIDS. *Pathogens*. 2021;10(8):1018.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10081018>
- Hokello J., Sharma A.L., Tyagi P., et al. Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1) transcriptional regulation, latency and therapy in the central nervous system. *Vaccines*. 2021;9(11):1272.
DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines9111272>
- Osborne O., Peyravian N., Nair M., et al. The paradox of HIV blood-brain barrier penetration and antiretroviral drug delivery deficiencies. *Trends Neurosci*. 2020;43(9):695–708.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.06.007>
- Huang C., Wang Y., Li X., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
- Conde Cardona G., Quintana Pájaro L.D., Quintero Marzola I.D., et al. Neurotropism of SARS-CoV 2: Mechanisms and manifestations. *J. Neurol. Sci*. 2020;412:116824.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116824>
- Mao L., Jin H., Wang M., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol*. 2020;77(6):683–90.
DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
- Puelles V.G., Lütgehetmann M., Lindemeyer M.T., et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med*. 2020;383(6):590–2.
DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmc2011400>
- Moriguchi T., Harii N., Goto J., et al. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int. J. Infect. Dis*. 2020;94:55–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.062>
- Zubair A.S., McAlpine L.S., Gardin T., et al. Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: A review. *JAMA Neurol*. 2020;77(8):1018–27.
DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2065>
- Cyranoski D. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature*. 2020;581(7806):22–6.
DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01315-7>
- Meinhardt J., Radke J., Dittmayer C., et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat. Neurosci*. 2021;24(2):168–75.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5>
- Мошков А.Е., Мошкова С.П., Львов Д.К. Белые крысы как модель при изучении экспериментальной инфекции альфавирусами. В кн.: *Итоги науки и техники. Серия «Вирусология». Арбовирусы и арбовирусные инфекции. Часть 1*. М.:1992:167–75. Moshkov A.E., Moshkova S.P., L'vov D.K. White rats as a model in the study of experimental infection with alphaviruses. *The results of science and technology. The series "Virology". Arboviruses and arbovirus infections. Part 1 [Itogi nauki i tekhniki. Seriya «Virusologiya». Arbovirusy i arbovirusnye infektsii. Chast' 1]*. Moscow;1992:167–75.
- Мошков А.Е., Урываев Л.В., Маренникова С.С., Мошков Д.А. Перспективы использования РНК-содержащих вирусов в качестве векторов. *Вопросы вирусологии*. 1993;38(3):98–101. Moshkov A.E., Uryvaev L.V., Marennikova S.S., Moshkov D.A. The prospects for using RNA-containing viruses as vectors. *Problems of Virology*. 1993;38(3):98–101.
EDN: <https://elibrary.ru/yoylll>
- Moshkov A.E., Moshkova S.P., Moshkov D.A., et al. Selection of the RNA-containing virus for working out of a vaccine against the AIDS associated complex. *Biotechnology*. 1999;(1):26–31.
- Geall A.J., Verma A., Otten G.R., et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012;109(36):14604–9.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1209367109>
- Fluet M.E., Whitmore A.C., Moshkoff D.A., et al. Effects of rapid antigen degradation and VEE glycoprotein specificity on immune responses induced by a VEE replicon vaccine. *Virology*. 2008;370(1):22–32.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.08.020>
- Jurgens C.K., Young K.R., Madden V.J., et al. A novel self-replicating chimeric lentivirus-like particle. *J. Virol*. 2012;86(1):246–61. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.05191-11>
- Петров А.А., Лебедев В.Н., Плеханова Т.М. и др. Перспективы разработки и применения вакцин на основе РНК-репликона вируса венесуэльского энцефаломиелиита лошадей против особо опасных вирусных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;(3):86–91. Petrov A.A., Lebedev V.N., Plekhanova T.M., et al. Future developments and applications of the vaccines against dangerous viral infections, RNA-replicon-based, obtained from the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;(3):86–91.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-3-86-91>
EDN: <https://elibrary.ru/snkbyd>
- Балтабекова А.Ж., Шагырова Ж.С., Ким Ю.Г. и др. Вектор на основе генома вируса венесуэльского энцефаломиелиита лошадей для экспрессии рекомбинантных белков в клетках млекопитающих. *Биотехнология. Теория и практика*. 2016;(2):59–69. Baltabekova A.Zh., Shagyrova Zh.S., Kim Yu.G., et al. A vector based on the genome of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus for the expression of recombinant proteins in mammalian cells. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. 2016;(2):59–69.
DOI: <https://doi.org/10.11134/btp.2.2016.5>
EDN: <https://elibrary.ru/wjcwoz>
- Montefiori D.C. Evaluating neutralizing antibodies against HIV, SIV, and SHIV in luciferase reporter gene assays. *Curr. Protoc. Immunol*. 2005;Chapter 12:12.11.1–12.11.17.
DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1211s64>
- Manak M.M., Moshkoff D.A., Nguyen L.T., et al. Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals. *AIDS*. 2010;24(18):2789–96.
DOI: <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e3283405c33>

22. Princen K., Hatse S., Vermeire K., et al. Establishment of a novel CCR5 and CXCR4 expressing CD4⁺ cell line which is highly sensitive to HIV and suitable for high-throughput evaluation of CCR5 and CXCR4 antagonists. *Retrovirology*. 2004;1:2. DOI: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-2>
23. Moshkoff A.E., Zaitsev I.Z., Moshkoff D.A. The analysis of alphaviral vectors for creation of an effective vaccine against a human immunodeficiency virus (HIV). In: *XIV International AIDS Conference*. Barcelona;2002:257–61.
24. Blakney A. The next generation of RNA vaccines: self-amplifying RNA. *Biochemist*. 2021;43(4). DOI: https://doi.org/10.1042/bio_2021_142
25. Moshkoff D.A., Moshkova I.I., Bogush A.I., et al. The cloning and expression of HIV gag and env genes in the vector systems based on the Sindbis virus genome. *Biotechnology*. 1999;15(1):32–9.
26. Moshkoff D.A. Expression of two HIV-1 structural open reading frames using alpha-virus replicon. *Transactions of the department of chemistry of natural compounds at the M.V. Lomonosov MIFCT*. 1999;(1):133–9.
27. Moshkov S.P., Grabareva L.P., Moshkov A.E., Gaïdamovich S.Ia. The immunity generated in white rats vaccinated with strains of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Problems of Virology*. 1991;36(5):417–9.
28. Reis E.C., Jacobson R.M., Tarbell S., Weniger B.G. Taking the sting out of shots: control of vaccination-associated pain and adverse reactions. *Pediatr. Ann.* 1998;27(6):375–86.
29. Weniger B.G. Influenza vaccination in the off-label grey zone. *Lancet*. 2014;384(9944):642–4. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61367-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61367-2)
30. Weniger B.G., Papania M.J. Alternative vaccine delivery methods. In: Plotkin S.A., Orenstein W.A., Offit P.A., eds. *Vaccines*. Saunders;2013:1200–31. DOI: <http://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00063-X>
31. Power C., Buist R., Johnston J.B., et al. Neurovirulence in feline immunodeficiency virus-infected neonatal cats is viral strain specific and dependent on systemic immune suppression. *J. Virol.* 1998;72(11):9109–15. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.9109-9115.1998>
32. Overbaugh J., Donahue P.R., Quackenbush S.L., et al. Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science*. 1988;239(4842):906–10. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2893454>
33. Fultz P.N., Zack P.M. Unique lentivirus – host interactions: SIVsmmPBj14 infection of macaques. *Virus Res.* 1994;32(2):205–25. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)90042-6](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)90042-6)
34. Tao B., Fultz P.N. Molecular and biological analyses of quasi-species during evolution of a virulent simian immunodeficiency virus, SIVsmmPBj14. *J. Virol.* 1995;69(4):2031–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.69.4.2031-2037.1995>
35. McKinney R.W. Inactivated and live VEE vaccines – a review. In: *Venezuelan encephalitis. Scientific publication no. 243*. Washington;1972:69–367.
36. Murphy F.A. Rabies pathogenesis. *Arch. Virol.* 1977;54(4):279–97. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf01314774>
37. Atasheva S., Kim D.Y., Frolova E.I., Frolov I. Venezuelan equine encephalitis virus variants lacking transcription inhibitory functions demonstrate highly attenuated phenotype. *J. Virol.* 2015;89(1):71–82. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02252-14>
38. Aguilar P.V., Estrada-Franco J.G., Navarro-Lopez R., et al. Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: hidden under the dengue umbrella. *Future Virol.* 2011; 6(6): 721–40. DOI: <https://doi.org/10.2217/fvl.11.5>
39. Благоев А.В., Букаева А.А., Макаров В.В., Бочкаева З.В. Эффективность и безопасность РНК-вакцин: что известно на сегодняшний день. *Медицинская иммунология*. 2021; 23(5):1017–30. Blagov A.V., Bukaeva A.A., Makarov V.V., Bochkaeva Z.V. Safety and efficacy of RNA vaccines: state of the art. *Meditsinskaya immunologiya*. 2021;23(5):1017–30. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-SAE-2320> EDN: <https://elibrary.ru/nazeez>
40. Davis N.L., Caley I.J., Brown K.W., et al. Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J. Virol.* 2000;74(1):371–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.1.371-378.2000>

Информация об авторах

Мошков Герман Дмитриевич — м. н. с. кафедры вирусологии Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0009-0598-6992>

Мошков Андрей Евгеньевич — г. н. с. отдела вирусологии U.S. Pharma Biotechnology Inc. Балтимор, США; советник Global Virus Network, Балтимор, США, <https://orcid.org/0000-0002-7101-2469>

Мошков Дмитрий Андреевич [✉] — к. б. н., с. н. с. кафедры вирусологии Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; основатель, г. н. с. U.S. Pharma Biotechnology Inc., Балтимор, США; советник Global Virus Network, Балтимор, США, moshkoffd@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-4009-5477>

Участие авторов: Мошков Г.Д. — молекулярно-генетические исследования, анализ сиквенсов, написание текста; Мошков А.Е. — анализ литературы, систематизация результатов, написание текста, редактирование статьи; Мошков Д.А. — идея и дизайн исследования, систематизация результатов, написание текста, утверждение окончательного варианта статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.08.2024;
принята к публикации 14.10.2024;
опубликована 30.10.2024

Information about the authors

Herman Dmitriyevich Moshkoff — junior scientist, Department of Virology, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0009-0598-6992>.

Andrey Evgenyevich Moshkoff — principal scientist, Department of Virology, U.S. Pharma Biotechnology Inc. Baltimore, MD, USA; Advisor, Global Virus Network, Baltimore, MD, USA, <https://orcid.org/0000-0002-7101-2469>.

Dmitry Andreyevich Moshkoff [✉] — Ph.D. in Biology, senior scientist, Department of Virology, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia; Founder, S.D., U.S. Pharma Biotechnology Inc., Baltimore, USA; Advisor, Global Virus Network, Baltimore, USA, moshkoffd@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-4009-5477>.

Author contribution: Moshkoff H.D. — molecular genetic studies, sequencing analysis, preparation of the article; Moshkoff A.E. — literature analysis, systematization of results, preparation of the article, editing of the article; Moshkoff D.A. — research idea and design, systematization of results, preparation of the article, approval of the final version of the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a 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 09.08.2024;
accepted for publication 14.10.2024;
published 30.10.2024



Получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и его антигенные и иммуногенные свойства

Лапин В.А., Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Мелентьев Д.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е., Новиков В.В.[✉]

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

Аннотация

Введение. Значимость норовирусов в инфекционной патологии человека и опасность возникновения крупных эпидемических вспышек в организованных коллективах обосновывают необходимость разработки средств специфической профилактики инфекции.

Цель работы — получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и анализ его иммуногенных и антигенных свойств.

Материалы и методы. Проведены компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, молекулярное клонирование, полимеразная цепная реакция, электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле и белков в полиакриламидном геле, аффинная хроматография, иммуноферментный анализ.

Результаты. Создана генетическая конструкция, кодирующая рекомбинантный VP1 норовируса генотипа GII с кодонами, оптимизированными для высокоэффективной экспрессии в *Escherichia coli*. Генетической конструкцией трансформирован штамм *E. coli* Rosetta 2 (DE3). Осуществлена экспрессия VP1 в клетках *E. coli*, оптимизированы условия для его продукции, очистки и ренатурации. Получен очищенный растворимый рекомбинантный белок VP1, формирующий вирусоподобные частицы диаметром 30–50 нм. Иммунизация белком мышей BALB/c вызвала образование антител с титром более 1 : 1000. При оценке антигенных свойств показано, что в крови волонтеров присутствуют антитела классов IgG, IgM, IgA, взаимодействующие с рекомбинантным VP1. Суммарная частота обнаружения антител составила 47,4%.

Заключение. Результаты обосновывают возможность использования рекомбинантного VP1 для создания отечественной вакцины для профилактики норовирусной инфекции.

Ключевые слова: норовирус, VP1, вирусоподобные частицы, вакцина

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 решением Локального этического комитета ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной (№ 4 от 25.11.2021).

Благодарность. Авторы выражают благодарность Н.А. Новиковой за предоставление штамма норовируса и А.Ю. Кашникову за помощь в проведении электронной микроскопии.

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: Лапин В.А., Новиков Д.В., Мохонова Е.В., Мелентьев Д.А., Цыганова М.И., Зайцев Д.Е., Новиков В.В. Получение рекомбинантного белка VP1 норовируса и его антигенные и иммуногенные свойства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):661–667.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-552>

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

Production of recombinant norovirus VP1 protein and its antigenic and immunogenic properties

Vladislav A. Lapin, Dmitry V. Novikov, Ekaterina V. Mokhonova, Dmitry A. Melentyev, Maria I. Tsiganova, Dmitry E. Zaitsev, Viktor V. Novikov[✉]

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

Abstract

Introduction. The importance of noroviruses in human infectious pathology and the danger of large epidemic outbreaks in organized groups determine the need to develop means of specific prevention of infection.

The aim of the study was to obtain recombinant norovirus VP1 protein and analyze its immunogenic and antigenic properties.

Materials and methods. Computer analysis of nucleotide and amino acid sequences, molecular cloning, polymerase chain reaction, electrophoresis of nucleic acids in agarose gel and proteins in polyacrylamide gel, affinity chromatography, enzyme immunoassay.

Results and discussion. A genetic construct encoding recombinant VP1 of the GII genotype norovirus with codons optimized for highly effective expression in *Escherichia coli* has been created. The strain of *E. coli* Rosetta 2 (DE3) has been transformed by genetic construct. VP1 expression was carried out in *E. coli* cells, conditions for its production, purification and renaturation were optimized. A purified soluble recombinant VP1 protein forms virus-like particles with a diameter of 30–50 nm. Immunization of BALB/c mice by protein lead to antibodies production with a titer greater than 1 : 1000. When evaluating antigenic properties, it was shown that human IgG, IgM, and IgA antibodies interact with recombinant VP1. The total antibody detection rate was 47,4%. The results indicate the possibility of using recombinant VP1 for development of domestic vaccine for the prevention of norovirus infection.

Keywords: norovirus, VP1, virus-like particles, vaccine

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 research protocol was approved by the decision of the Local Ethics Committee of the Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 4, November 25, 2021).

Acknowledgement. The authors would like to thank N.A. Novikova for providing the norovirus strain and A.Yu. Kashnikov for assistance in electron microscopy.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Lapin V.A., Novikov D.V., Mokhonova E.V., Melentyev D.A., Tsiganova M.I., Zaitsev D.E., Novikov V.V. Production of recombinant norovirus VP1 protein and its antigenic and immunogenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):661–667.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-552>

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

Введение

В этиологической структуре вирусных острых кишечных инфекций норовирусы (НВ; сем. *Caliciviridae*, род *Norovirus*) находятся на 2-м месте после ротавирусов. В странах, проводящих вакцинацию против ротавирусов, НВ вышли на 1-е место [1, 2]. В группы риска заражения НВ входят дети, молодые и пожилые люди. Вспышки инфекции НВ регистрируются в течение всего года с подъёмом заболеваемости в весенние и летние месяцы.

НВ человека представляет собой икосаэдрический вирус без оболочки, имеет геном в виде одноцепочечной позитивно-смысловой РНК длиной примерно 7,5–7,7 кб, кодирующей 3 открытые рамки считывания. Капсид вируса построен из наружного (VP1) и внутреннего (VP2) белков. ORF1 кодирует большой полипротеин, предшественник 6 неструктурных белков (NS1/2–NS7), ORF2 — основной структурный белок VP1 капсида, ORF3 — минорный структурный белок VP2 капсида, который расположен внутри вирусной частицы. VP1 способен самособирается в вирусоподобные частицы, которые практически неотличимы от нативных вирионов и обладают выраженными иммуногенными свойствами.

Для НВ известны 10 геногрупп, на основе анализа аминокислотной последовательности наружного капсидного белка VP1 выделены 48 генотипов. Наиболее распространённой геногруппой НВ является GII, на долю которой в России приходится большинство случаев НВ-гастроэнтерита детей первых лет жизни. Так, в Свердловской области в 2022 г. наибольший удельный вес в генотипической структуре циркулирующих НВ занимали НВ, относящиеся к геногруппе GII (58%) Сходные данные были получены в ходе молекулярно-эпидемиологического анализа генетических вариантов НВ в ряде других европейских стран, Японии и Китае. В отдельные годы на долю геногруппы GII приходилось до 80–90% случаев НВ-гастроэнтерита детей. К доминирующим вариантам вируса этой геногруппы относят НВ GII.4 [3, 4]. Значимость НВ в инфекционной патологии человека и опасность возникновения крупных эпидемических вспышек в организованных коллективах определяют необходимость разработки средств специфической профилактики инфекции. На примере успешного внедрения ротавирусной вакцины показано, что программы вакцинации могут значительно снизить количество случаев гастроэнтерита [5]. На основе белков НВ

в мире также разрабатывается несколько кандидатных вакцин против НВ, две из которых в настоящее время находятся на II/III стадии клинических испытаний и предназначены для профилактики инфекции НВ у детей и взрослых [6, 7].

Целью работы явилось получение и анализ иммуногенных и антигенных свойств рекомбинантного белка НВ VP1.

Материалы и методы

Анализ нуклеотидных последовательностей, дизайн олигонуклеотидов, конструирование гена, расчёт молекулярной массы белка, изоэлектрической точки и коэффициента экстинкции осуществляли с помощью пакета программного обеспечения «Lasergene 7.1.0» («Dnastar, Inc.»). Оптимизацию кодонов проводили на основе базы данных Codonusage database¹. В работу была взята нуклеотидная последовательность VP1 эпидемического варианта НВ с генотипом GII.4, доминирующего на территории Нижегородской области. Нуклеотидные последовательности секвенировали с использованием генетического анализатора «ABI Prism 310» («Thermo Fisher Scientific»).

Клетки *Escherichia coli*, штамм Rosetta 2 (DE3), трансформированные полученной генетической конструкцией на основе плазмиды pET22b и кодирующей VP1 НВ, выращивали в среде LB-Miller pH 7,0. Индукцию синтеза белка проводили путём добавления изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 0,5 мМ к каждой культуре. Биомассы клеток получали центрифугированием, лизировали в растворе, содержащем 25 мМ HEPES (pH 7,5), 1 М NaCl, 10% глицерина, 1% Triton X-100, ДНКазы I (10 мкг/мл), РНКазы А (10 мкг/мл), лизоцима (50 мкг/мл), 0,2 мМ фенол-метилсульфонилфторида, дезинтегрировали ультразвуком с помощью «QSonica Q55» («QSonica sonicators»), центрифугировали и добавляли промытый буфер, содержащий 25 мМ HEPES pH 7,5, 1 М NaCl, 10% глицерина, 1 М мочевины с последующим центрифугированием.

Выделение VP1 НВ проводили методом металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях с помощью сорбента Ni-NTA Superflow («GEHealthcare»). Ренатурацию VP1 осуществляли с помощью диализа. Электрофорез белков в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили общепринятым методом, иммуноблоттинг — с использованием сывороточных антител (АТ) человека против VP1 НВ и конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных АТ к IgG человека «Hytest». После переноса белки на мембране окрашивали в растворе субстрата Super Signal West Dura Extended

Duration Substrate («Thermo Scientific») и измеряли хемиллюминесценцию с помощью сканера «C-DiGit Blot Scanner» («Li-Cor»). Микрофотографии вирусоподобных частиц, образуемых VP1 НВ, получали с помощью электронного микроскопа «HT7700» («Hitachi»). Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c возрастом 8 нед и массой 16–18 г. Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственными стандартами ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014. Биоматериал для исследования брали у мышей с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах европейского сообщества (86/609/ЕС).

Исследования проводили согласно биоэтическим и этическим принципам, установленным Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. и пересмотренной в октябре 2013 г.). Для оценки антигенных свойств рекомбинантных белков использовали 637 образцов плазмы крови, полученных из диагностического центра «Гемохелп» (ООО «ТИАС ЛОТУС») от лиц в возрасте 19–44 лет, обратившихся для проведения диагностических исследований и давших письменное согласие на использование их биоматериала в исследовании.

АТ к VP1 НВ определяли с помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа. VP1 сорбировали в лунки планшетов в концентрации 1 мкг/мл в течение 18 ч при 20°C. Тестируемую сыворотку крови мышей разводили с шагом 2, плазму крови волонтеров разводили перед тестированием с шагом 10. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированных мышей. При определении АТ в крови лабораторных животных использовали конъюгированные с пероксидазой корня хрена кроличьи АТ против иммуноглобулинов мыши. При определении АТ человека использовали конъюгированные с пероксидазой хрена кроличьи АТ против иммуноглобулинов классов G, M и A (IgG, IgM, IgA). За положительную реакцию принимали значение оптической плотности больше среднего значения отрицательного контроля, умноженного на 3.

Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения «Microsoft Excel» («Microsoft»). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Graph Pad Prism 8» («Graph Pad Software»). Различия в данных считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

В начало нуклеотидной последовательности, кодирующей белок VP1 эпидемически значимого штамма НВ генотипа GII.4, был внесён сайт для эндонуклеазы рестрикции NdeI. К последовательности, кодирующей C-терминальную часть белка, была добавлена нуклеотидная последовательность, коди-

¹ URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

рующая 6 гистидинов, стоп-кодон (TAA) и сайт для рестриктазы XhoI, использованные для последующего молекулярного клонирования. Схематичное строение гена представлено на **рис. 1**. Полученную последовательность синтезировали в фирме «Евроген». Последовательность, кодирующая VP1, была перенесена в плазмиду pET22b («Thermo Fisher Scientific»), позволяющую с высокой эффективностью экспрессировать рекомбинантные белки в штаммах *E. coli*, содержащих в геноме DE3 лизоген [8].

Полученной генетической конструкцией, кодирующей VP1 НВ, трансформировали клетки *E. coli*, штамм Rosetta 2 (DE3). Была оценена эффективность продукции белка, составившая 20–40 мг белка на 1 л клеточной культуры. Белок формировал «тельца включения». Определён оптимальный состав среды и условия культивирования трансформированных клеток *E. coli*. Максимальная плотность культуры клеток ($OD_{600} = 2,8$) соответствовала 5 г биомассы на 1 л культуры в среде LB, содержащей 0,5% глицерина и 25 мМ фосфатного буфера pH 7,4. Оптимальная концентрация изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозиды составила 0,5 мМ, оптимальная температура для экспрессии белков — 30°C, время индукции — 4–8 ч.

В результате последующей очистки с помощью металл-хелатной хроматографии в присутствии 8 М мочевины и рефолдинга путём диализа против раствора, содержащего 25 мМ HEPES pH 7,5, 150 мМ NaCl и 5% глюкозы, получен растворимый белок, состоящий из 560 аминокислот, имеющий расчётную молекулярную массу 60,6 кДа, изоэлектрическую точку, равную 6,15, и коэффициент экстинкции 1,04 (**рис. 2, а**).

Белок наработан в препаративных количествах и использован для оценки способности формировать вирусоподобные частицы и для иммунизации лабораторных мышей. На **рис. 2, б** представлена электронно-микроскопическая фотография, свидетельствующая о способности рекомбинантного белка VP1 образовывать вирусоподобные частицы диаметром 30–50 нм, что соответствует данным других авторов [9]. При этом вестерн-блот (**рис. 2, в**) показал способность рекомбинантного VP1 взаимодействовать с сывороточными АТ серопозитивных лиц.

Двукратная внутрибрюшинная иммунизация 10 лабораторных мышей с интервалом в 2 нед и последующим получением сыворотки крови через 3 нед после 2-й иммунизации в дозе 10 мкг (0,5 мл) приводила к образованию в крови животных АТ против VP1 НВ. АТ в крови животных обнаруживались в титрах от 1 : 1024 до 1 : 4096, средний титр составил величину, равную 1 : 1536. Иммунизация животных той же дозой белка по той же схеме, но в смеси с 100 мг гидроксида алюминия вызвала появление АТ к VP1 НВ в титрах до 1 : 32 768. В среднем

титр АТ был равен 1 : 13 720, что почти на порядок превышало титры АТ у животных, иммунизированных без гидроксида алюминия (**рис. 3**). Таким образом, показано, что полученный рекомбинантный белок способен вызвать выраженный антительный ответ, значительно повышающийся в присутствии использованного адьюванта.

Поскольку НВ широко циркулирует среди населения, закономерно ожидать наличие АТ к его

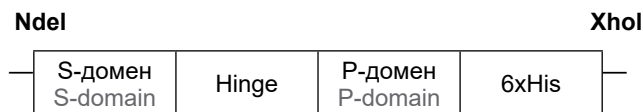


Рис. 1. Схематичное строение генетической конструкции, кодирующей VP1 НВ в составе pET22b.

Fig. 1. Schematic representation of the genetic construct encoding VP1 of norovirus in pET22b.

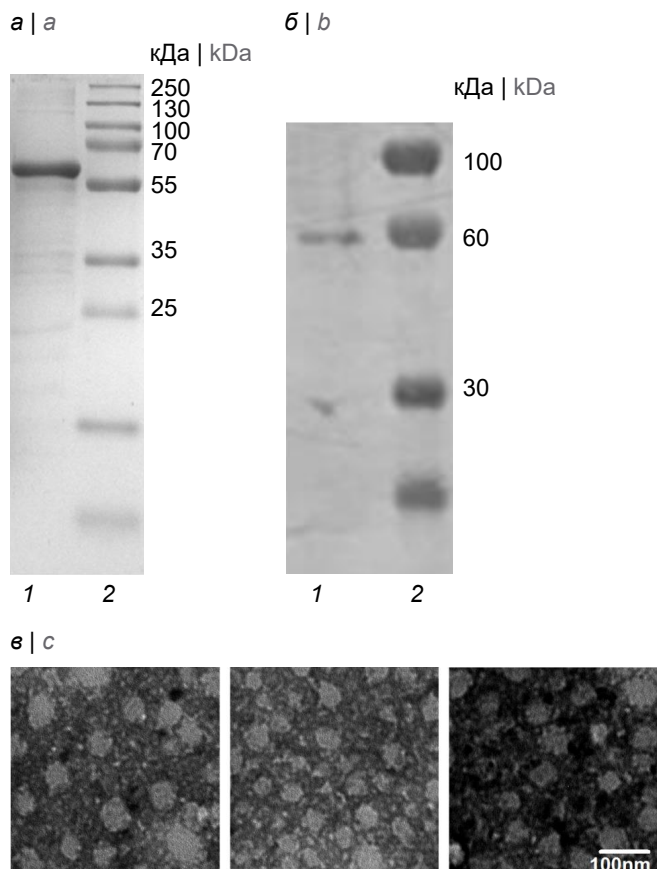


Рис. 2. Характеристика рекомбинантного белка VP1.

а — электрофореграмма очищенного VP1 белка НВ; **б** — вестерн-блот рекомбинантного VP1 НВ; 1 — VP1; 2 — маркеры молекулярной массы; **в** — электронно-микроскопические фотографии вирусоподобных частиц, образуемых рекомбинантным VP1 НВ. Контрастирование 3% уранилацетатом pH 4,6.

Fig. 2. Characteristics of the recombinant VP1 protein.

а — electrophoregram of purified norovirus VP1 protein; **б** — Western-blot of purified norovirus VP1 protein; 1 — VP1; 2 — molecular weight marker; **с** — electron microscopic photographs of virus-like particles formed by recombinant norovirus VP1. Contrast with 3% uranyl acetate, pH 4.6.

белкам в крови людей. Проведена оценка наличия АТ разных классов к полученному рекомбинантному белку в крови лиц, проживающих в средней полосе России. Определяли частоту обнаружения АТ к VP1 в образцах плазмы крови 637 волонтеров. Как следует из **рис. 4**, АТ класса IgG обнаруживались у 14,8% волонтеров, АТ класса IgM — у 7,1%, АТ класса IgA — у 38,5%. Суммарная встречаемость АТ составила 47,4%.

Результаты свидетельствуют о том, что эпитопы полученного нами рекомбинантного VP1 НВ GII.4 распознаются АТ, присутствующими в крови человека. Однако титры АТ класса IgG в большинстве своем были невелики и превышали у серопозитивных волонтеров величину, равную 1 : 1000 и более, только в 4,3% случаев (4 из 94), что свидетельствует о давнем инфицировании этих лиц НВ. У волонтеров, имевших АТ к VP1 НВ класса IgA, высокие титры (равные 1 : 1000 и более) обнаруживались со сходной частотой (4,9% случаев). В то же время из 25 волонтеров, имевших АТ к VP1 НВ класса IgM, титры, равные 1 : 1000 и более, обнаружены в 16% случаев. Вероятно, эти лица имели недавний контакт с вирусом.

Обсуждение

Полученные данные о частоте встречаемости АТ против VP1 НВ GII.4 и их титрах соответствуют результатам других авторов. Сообщается о широком разбросе в частоте обнаружения АТ и их титрах у лиц разного возраста, проживающих в разных странах. Суммарная частота обнаружения колеблется от 25 до 95%. При этом наблюдается перекрестная реактивность с НВ других геногрупп [10, 11].

Белок VP1 НВ состоит из 2 доменов, принимающих участие в самосборке вирусоподобных частиц [12]. Способность VP1 НВ к самосборке может быть использована для получения образующих вирусоподобные частицы химерных белков, состоящих из S-домена VP1 НВ и фрагментов других белков, выступающих в качестве антигена. То есть, существует возможность декорирования разными антигенами вирусоподобных частиц НВ, что продемонстрировано в работах ряда авторов [13–15]. Генетическая конструкция, кодирующая полученный нами рекомбинантный белок, может быть применена в качестве молекулярной платформы для создания химерных вирусоподобных частиц на основе VP1 НВ.

Заключение

Полученный нами рекомбинантный VP1 НВ, экспрессированный в *E. coli*, способен формировать вирусоподобные частицы, проявляет иммуногенность у мышей в отсутствие и в присутствии адъюванта и распознается АТ человека классов IgG, IgM, IgA. Результаты работы свидетельствуют о

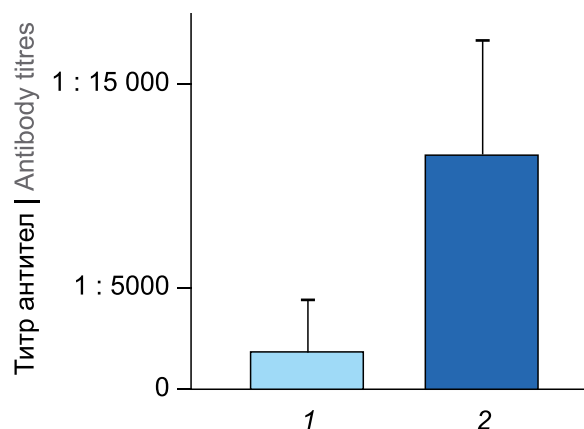


Рис. 3. Титры АТ у мышей, иммунизированных рекомбинантным VP1 НВ.

1 — без гидроокиси алюминия; 2 — с гидроокисью алюминия.

Fig. 3. Antibody titers in mice immunized with recombinant norovirus VP1.

1 — without aluminum hydroxide; 2 — with aluminum hydroxide.

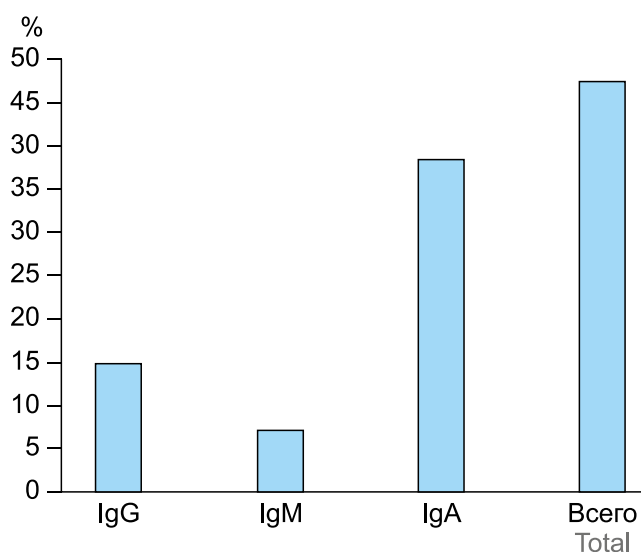


Рис. 4. Частота детекции АТ разных классов к рекомбинантному VP1 НВ в крови здоровых волонтеров.

Fig. 4. Detection rate of antibodies of different classes to recombinant norovirus VP1 in the blood of healthy volunteers.

возможности использования рекомбинантного VP1 в качестве антигена при конструировании вакцины для профилактики инфекции НВ, основанной на вирусоподобных частицах.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Black R.E., Perin J., Yeung D., et al. Estimated global and regional causes of deaths from diarrhoea in children younger than 5 years during 2000-21: a systematic review and Bayesian multinomial analysis. *Lancet Glob. Health.* 2024;12(6):e919–28. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(24\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(24)00078-0)
2. Jeon K., Lee S.K., Jeong S., et al. Trends in the detection of viruses causing gastroenteritis over a 10-year period and impact of non-

- pharmaceutical interventions. *J. Clin. Virol.* 2024;172:105676. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2024.105676>
3. van Beek J., de Graaf M., Al-Hello H., et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect. Dis.* 2018;18(5):545–53. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30059-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30059-8)
 4. Быков Р.О., Скрыбина С.В., Килячина А.С. и др. Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека отдельных муниципалитетов в Свердловской области за 2022 год. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2023;100(4):306–313. Bykov R.O., Scriabina S.V., Kilyachina A.S., et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of human norovirus infection in individual municipalities of the Sverdlovsk region in 2022. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2023; 100(4):306–13. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-402> EDN: <https://elibrary.ru/qiehre>
 5. Burnett E., Parashar U., Tate J. Rotavirus vaccines: effectiveness, safety, and future directions. *Paediatric Drugs.* 2018;20:223–33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40272-018-0283-3>
 6. Treanor J., Sherwood J., Cramer J.P., et al. A phase 2 study of the bivalent VLP norovirus vaccine candidate in older adults; impact of MPL adjuvant or a second dose. *Vaccine.* 2020;38(36):5842–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.011>
 7. López P., López-Medina E., Sáez-Llorens X., et al. Immunogenicity and tolerability of a bivalent virus-like particle norovirus vaccine candidate in children from 6 months up to 4 years of age: a phase 2 randomized, double-blind trial. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2023;19(1):2204787. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2204787>
 8. Mokhonov V.V., Vasilenko E.A., Gorshkova E.N., et al. SlyD-deficient *Escherichia coli* strains: a highway to contaminant-free protein extraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;499(4):967–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.029>
 9. Lampinen V., Gröhn S., Soppela S., et al. SpyTag/SpyCatcher display of influenza M2e peptide on norovirus-like particle provides stronger immunization than direct genetic fusion. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2023;13:1216364. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1216364>
 10. Kobayashi S., Fujiwara N., Rockx B., et al. Characterization of the homo- and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. *J. Med. Virol.* 2005;77:439–46. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.20473>
 11. Takeda N., Minagawa H. Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.* 2009;53:356–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00132.x>
 12. Tan M., Fang P., Chachiyo T., et al. Noroviral particle: structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology.* 2008;382:115–23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.047>
 13. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., и др. Получение вирусоподобных частиц норовируса, содержащих VP1 эховируса 30. *Вопросы вирусологии.* 2021;66(5):383–9. Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., et al. Construction of norovirus (Caliciviridae: Norovirus) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B). *Problems of Virology.* 2021;66(5):383–9. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79> EDN: <https://elibrary.ru/mkbbqt>
 14. Tamminen K., Heinimäki S., Vesikari T., Blazevic V. Rotavirus VP6 adjuvant effect on norovirus GII.4 virus-like particle uptake and presentation by bone marrow-derived dendritic cells in vitro and in vivo. *J. Immunol. Res.* 2020;2020:3194704. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/3194704>
 15. Boonyakida J., Khoris I.M., Nasrin F., Park E.Y. Improvement of modular protein display efficiency in SpyTag-implemented norovirus-like particles. *Biomacromolecules.* 2023;24(1): 308–18. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01150>

Информация об авторах

Лапин Владислав Александрович — м. н. с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5905-5722>

Новиков Дмитрий Викторович — к. б. н., в. н. с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

Мохонова Екатерина Валерьевна — н. с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9742-7646>

Мелентьев Дмитрий Александрович — м. н. с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2441-6874>

Цыганова Мария Игоревна — к. б. н., в. н. с. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2811-6844>

Зайцев Дмитрий Евгеньевич — старший лаборант лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7663-6924>

Новиков Виктор Владимирович[✉] — д. б. н., проф., зав. лаб. иммунохимии ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия, mbre@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

Участие авторов: Лапин В.А. — проведение экспериментов, написание и оформление рукописи; Новиков Д.В. — дизайн исследования, анализ литературы и экспериментальных данных; Мохонова Е.В., Мелентьев Д.А., Зайцев Д.Е. — проведение экспериментов; Цыганова М.И. — редактирование рукописи; Нови-

Information about the authors

Vladislav A. Lapin — junior researcher, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5905-5722>

Dmitry V. Novikov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

Ekaterina V. Mokhonova — researcher, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9742-7646>

Dmitry A. Melentyev — junior researcher, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2441-6874>

Maria I. Tsyganova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2811-6844>

Dmitry E. Zaitsev — senior laboratory assistant, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7663-6924>

Viktor V. Novikov[✉] — D. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Sci-

ков В.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи, руководство. 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 14.06.2024;
принята к публикации 06.09.2024;
опубликована 29.10.2024

entific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia, mbre@mail.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

Author contribution: *Lapin V.A.* — conducting experiments, writing and formatting the manuscript; *Novikov D.V.* — research design, analysis of literature and experimental data; *Mokhonova E.V.*, *Melentyev D.A.*, *Zaitsev D.E.* — conducting experiments, *Tsyganova M.I.* — editing the manuscript; *Novikov V.V.* — concept and design of the study, editing the manuscript, manual. 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 14.06.2024;
accepted for publication 06.09.2024;
published 29.10.2024

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-564>



Детекция генетических детерминант потенциально онкогенных представителей микробиоты кишечника в качестве биомаркеров колоректального рака

Шумилова В.Н.^{1✉}, Гончаров А.Е.^{1,2}, Азаров Д.В.^{1,2}, Ситкин С.И.^{1,2,3}, Латария Э.Л.¹, Асланов Б.И.¹, Бобраков М.А.¹, Топузов Р.Э.¹

¹Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

³Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Колоректальный рак (КРР) является второй по значимости причиной смертности от рака в мире. Для скрининга КРР применяются неинвазивные методы диагностики, основанные на определении скрытой крови в стуле (фекальный иммунохимический тест, гваяковый тест), хорошо зарекомендовавшие себя в клинических исследованиях. Однако существенным недостатком неинвазивных методов диагностики является невысокая чувствительность при выявлении онкологического процесса на ранних стадиях. В ряде современных работ обсуждается связь заболевания с различными потенциально онкогенными микроорганизмами (МО) в кишечном тракте человека, которые могут быть использованы для расширения арсенала неинвазивных методов диагностики КРР на основе молекулярно-генетического исследования образца кала для идентификации онкогенных МО.

Цель исследования — оценка возможности использования генетических детерминант потенциально онкогенных МО в качестве маркеров КРР, основанная на сопоставлении их распространённости в группах пациентов с КРР, факультативными предраковыми состояниями и пациентов без патологии кишечника.

Материалы и методы. В исследование, организованное по дизайну «случай—контроль», было включено 215 участников: 70 пациентов с впервые выявленным КРР, 70 пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, 75 участников без диагностированной патологии кишечника. Детекцию генов потенциально онкогенных МО осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции.

Результаты и обсуждение. Установлена связь между КРР и наличием гена фрагилизина *Bacteroides fragilis* (ОШ = 7,00; 95% ДИ 2,55–22,50; $p < 0,001$), видоспецифических генов пародонтопатогенных МО *Fusobacterium nucleatum* (ОШ = 5,61; 95% ДИ 2,87–11,30; $p < 0,001$) и *Porphyromonas gingivalis* (ОШ = 16,3; 95% ДИ 4,33–106,00; $p < 0,001$), гена *clbB* острова патогенности *pks* энтеробактерий (ОШ = 3,44; 95% ДИ 1,39–8,51; $p = 0,010$).

Заключение. Наличие в составе кишечного микробиома генетических маркеров потенциально онкогенных видов бактерий ассоциировано с КРР. Полученные результаты обосновывают возможность применения молекулярно-генетической детекции изученных потенциально онкогенных МО в качестве метода неинвазивной диагностики КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, микробиота, микробные маркеры, потенциально онкогенные микроорганизмы, неинвазивная диагностика, скрининг

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов и было одобрено на заседании Локального этического комитета СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол № 10 от 03.11.2021).

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: Шумилова В.Н., Гончаров А.Е., Азаров Д.В., Ситкин С.И., Латария Э.Л., Асланов Б.И., Бобраков М.А., Топузов Р.Э. Детекция генетических детерминант потенциально онкогенных представителей микробиоты кишечника в качестве биомаркеров колоректального рака. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):668–678.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-564>

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

Detection of genetic determinants of potentially oncogenic representatives of the intestinal microbiota as biomarkers of colorectal cancer

Viktoriya N. Shumilova¹✉, Artemij E. Goncharov^{1,2}, Daniil V. Azarov^{1,2}, Stanislav I. Sitkin^{1,2,3}, Elgudzha L. Latariya¹, Batyrbek I. Aslanov¹, Mihail A. Bobrakov¹, Rustem J. Topuzov¹

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

²Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

³Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Relevance. Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer mortality worldwide. Non-invasive diagnostic methods based on the determination of hidden blood in the stool (fecal immunochemical test, guaiac test), which have been proven to be effective in clinical studies, are used for CRC screening. However, a significant disadvantage of the available non-invasive diagnostic methods is the low sensitivity in detecting the oncological process at the early stages. A number of recent studies discuss the relationship between the disease and various potentially oncogenic microorganisms in the human intestinal tract, which can be used to expand the arsenal of non-invasive methods for diagnosing CRC based on molecular genetic examination of a stool sample to identify oncogenic microorganisms.

The aim of this study was to evaluate the possibility of using genetic determinants of potentially oncogenic microorganisms as markers for colorectal cancer, based on a comparison of their prevalence in groups of patients with colorectal cancer, facultative precancerous diseases and patients without intestinal pathology.

Materials and methods. 215 participants were included in the "case-control" study: 70 patients with newly diagnosed colorectal cancer, 70 patients with inflammatory bowel disease, 75 participants without diagnosed intestinal pathology. Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify and detect genes of potentially oncogenic microorganisms.

Results and discussion. An association was found between CRC and the presence of the *Bacteroides fragilis* fragilisin gene (OR 7.00; 95% CI: 2.55–22.50; $p < 0.001$), species-specific genes of the periodontal pathogenic microorganisms *Fusobacterium nucleatum* (OR 5.61; 95% CI: 2.87–11.30; $p < 0.001$) and *Porphyromonas gingivalis* (OR 16.3; 95% CI: 4.33–106.00; $p < 0.001$), the *clbB* gene of *pks* pathogenicity island of the Enterobacteria (OR 3.44; 95% CI: 1.39–8.51; $p = 0.010$).

Conclusion. The presence of genetic markers of potentially oncogenic bacterial species and genotypes in the gut microbiome is associated with colorectal cancer. The results obtained support the possibility of using molecular genetic detection of the studied potentially oncogenic microorganisms as a method for non-invasive diagnosis of CRC.

Keywords: colorectal cancer, microbiota, microbial markers, potentially oncogenic microorganisms, non-invasive diagnosis, screening

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (protocol No. 10, November 3, 2021).

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: Shumilova V.N., Goncharov A.E., Azarov D.V., Sitkin S.I., Latariya E.L., Aslanov B.I., Bobrakov M.A., Topuzov R.J. Detection of genetic determinants of potentially oncogenic representatives of the intestinal microbiota as biomarkers of colorectal cancer. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):668–678. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-564>
EDN: <https://www.elibrary.ru/fximcu>

Введение

Колоректальный рак (КРР) является 3-м по распространённости видом рака и 2-й по значимости причиной смертности от рака в мире [1]. Обращает на себя внимание тренд на рост заболева-

емости КРР среди лиц моложе 50 лет [2]. Для выявления онкологических заболеваний толстой кишки применяются неинвазивные (тест на скрытую кровь в стуле, гваяковый тест и фекальный иммунохимический тест (ФИТ)) и инвазивные (гибкая ректороман-

носкопия, колоноскопия) методы диагностики. Очевидными преимуществами неинвазивных методов диагностики являются их простота и доступность для скрининговых обследований лиц из групп риска.

Использование в скрининговых исследованиях методов неинвазивной диагностики, таких как ФИТ, позволяет добиться снижения смертности от КРР на 27% [3]. Метаанализ результатов 4 рандомизированных контролируемых исследований продемонстрировал, что применение гваякового теста и гибкой ректороманоскопии способствует снижению смертности от КРР на 18 и 26% соответственно [4].

Однако существенным недостатком неинвазивных методов является их невысокая диагностическая чувствительность на ранних стадиях заболевания. Так, чувствительность ФИТ на I стадии КРР составляет 68% (95% ДИ 57–78%), на II — 92% (95% ДИ 87–96%), на III — 82% (95% ДИ 73–89%) [5]. Таким образом, существует необходимость расширения арсенала доступных неинвазивных методов для скрининга КРР.

В качестве диагностических маркеров КРР могут выступать особенности количественного и качественного состава микробиоты, что подробно рассмотрено в обзорах, посвящённых роли кишечной микробиоты в развитии и диагностике онкологических заболеваний кишечника [6, 7]. Многочисленные исследования выявили изменения в составе микробиома кишечника, ассоциированные с развитием КРР, что позволяет предположить возможность использования идентификации отдельных представителей кишечного микробиома в качестве самостоятельного метода неинвазивной диагностики КРР или дополнения к существующим неинвазивным методам.

Первая модель классификации, основанная на микробных маркерах кишечника и позволявшая отличать пациентов с КРР от контроля, была предложена G. Zeller и соавт. [8]. Алгоритм классификации включал данные об относительной численности 22 видов микроорганизмов (МО), однако по крайней мере половину предсказательной силы модели определяли всего 4 вида: два вида *Fusobacterium*, *Porphyromonas asaccharolytica* и *Peptostreptococcus stomatis*, представленность каждого из которых была повышена при КРР.

Авторы из Китайского университета Гонконга разработали диагностическую модель, демонстрирующую специфичность 81,2% и чувствительность 93,8% при сочетании ФИТ и 4 бактериальных маркеров (ген-маркер “m3” “*Lachnoclostridium*” sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Hungatella hathewayi* (базоним: *Clostridium hathewayi*) и *Bacteroides clarus*) [9]. В более раннем исследовании экспериментальная модель на основе 23 МО семейств *Oscillospiraceae* (гетеротипический синоним: *Ruminococcaceae*) и *Lachnospiraceae*, ро-

дов *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Parabacteroides*, *Collinsella* и семейства *Enterobacteriaceae* выявила в выборке из 490 пациентов 91,7% случаев КРР по сравнению с 75,0% случаев, выявленных с помощью ФИТ [10].

К числу МО, наиболее тесно ассоциированных с КРР, относятся как некоторые патобионты полости рта, так и кишечные бактерии. Первые, помимо уже упомянутых представителей родов *Fusobacterium*, *Porphyromonas* и *Peptostreptococcus*, включают *Parvimonas micra*, *Gemella morbillorum*, *Tannerella forsythia* и некоторые другие виды [11]. Кишечные бактерии чаще всего представлены энтеротоксигенными штаммами *Bacteroides fragilis*, патогенными и условно-патогенными бактериями семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter rodentium*), а также *Campylobacter jejuni*, *Morganella morganii*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridioides difficile* и др. [12].

На основании результатов обзора литературы были отобраны МО, наиболее часто ассоциированные с КРР по данным исследований. К числу потенциально онкогенных МО мы отнесли колибактин-продуцирующие энтеробактерии, несущие гены *clbA* и *clbB* в составе острова патогенности *pks*, фрагилизин-продуцирующие *Bacteroides fragilis*, несущие ген *bft*, пародонтопатогенные бактерии *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* [6]. Дополнительным фактором в пользу включения указанных МО в список потенциальных онкогенов послужила их связь со стадийностью (прогрессированием) КРР, прогнозом/выживаемостью и резистентностью к терапии у пациентов с КРР [13, 14].

С учётом вероятных региональных, этнических и прочих особенностей количественного и качественного состава кишечной микробиоты, актуальна оценка распространённости указанных выше потенциально онкогенных МО среди населения России и их роли в развитии КРР.

Целью настоящего исследования является оценка возможности использования генетических детерминант потенциально онкогенных МО в качестве маркеров КРР, основанная на сопоставлении их распространённости в группах пациентов с КРР, факультативными предраковыми состояниями и пациентов без патологии кишечника.

Материалы и методы

На базе клинических подразделений Клиники им. Петра Великого СЗГМУ им. И.И. Мечникова и Городского онкологического диспансера Санкт-Петербурга в 2022–2024 гг. проведено исследование «случай–контроль». В исследовании приняли участие 215 человек: группа из 70 пациентов с диагностированным КРР (группа КРР); группа из 70 пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (язвенный колит, болезнь Крона — группа ВЗК);

75 участников без диагностированной патологии кишечника (контрольная группа). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов и было одобрено на заседании Локального этического комитета СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол № 10 от 03.11.2021).

В группе пациентов с КРР распределение по стадиям онкологического процесса с учётом классификации TNM было следующим: 0 стадия — 1 пациент; I стадия — 17 пациентов; II — 13 пациентов; III — 37 пациентов; IV — 12 пациентов.

Критерии включения в исследование пациентов из группы КРР: возраст старше 18 лет; установленный впервые на основании данных анамнеза, физикального обследования, морфологического исследования опухолевого материала, данных инструментальных и лабораторных методов обследования диагноз КРР; получение от пациента клинического материала (кал).

Критерии включения в исследование пациентов из группы ВЗК: возраст старше 18 лет; установленный диагноз ВЗК.

Критерии включения в исследование пациентов из контрольной группы: возраст старше 18 лет; отсутствие диагностированных ВЗК и КРР.

Критерии исключения для всех групп исследования: приём антибактериального препарата за последние 30 дней и/или прохождение эндоскопического исследования (колоноскопии, ректороманоскопии) за последние 14 дней до сдачи клинического материала (кал).

Образцы клинического материала, полученные от участников исследования, до проведения молекулярно-генетических исследований хранили при температуре -20°C .

ДНК из образцов фекалий для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) выделяли ме-

тодом сорбции на магнитных частицах с использованием набора реагентов «MetaFec» («Raisol»). В постановке ПЦР были применены последовательности праймеров, использованные ранее для идентификации потенциально онкогенных МО (табл. 1).

Для идентификации потенциально онкогенных МО была проведена количественная ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией (термоциклер «Bio-Rad CFX96») для *clbB pks+* и качественная ПЦР (термоциклер «Bio-Rad T100 Thermal Cycler») с электрофоретической детекцией для остальных маркеров.

Случаев неспецифической амплификации выявлено не было.

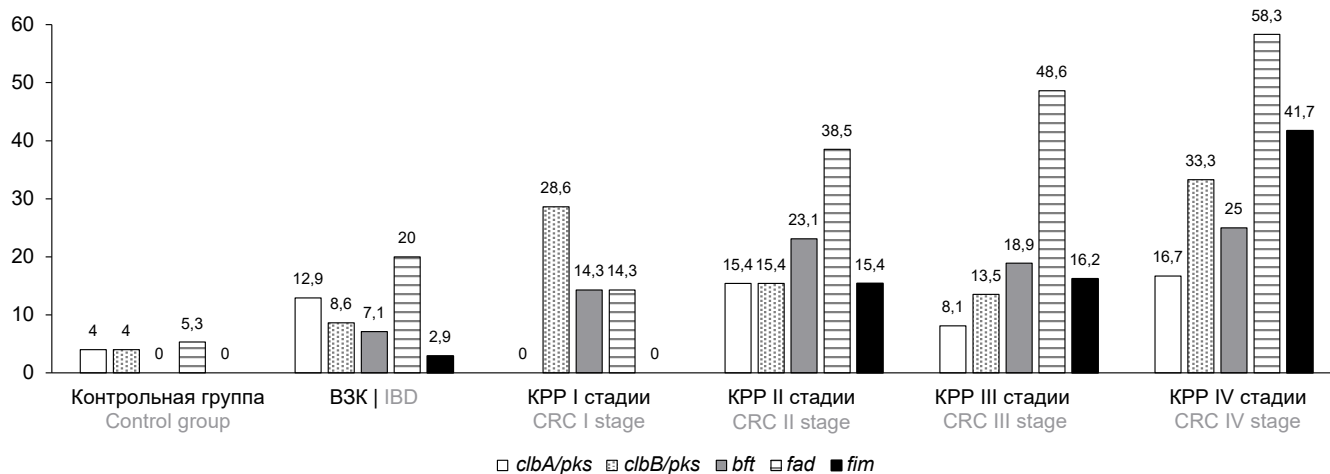
Валидацию результатов амплификации маркерных генов проводили методом капиллярного секвенирования ампликонов на приборе «GenomeLab GeXP» («Beckman Coulter, Inc.»), при этом во всех случаях были получены последовательности, соответствующие последовательностям целевых фрагментов маркерных генов, представленным в GenBank (табл. 1). Аликвоты тотальной ДНК из первых 5 образцов биологического материала, в которых были получены положительные результаты ПЦР, после подтверждения специфичности амплификации секвенированием были использованы в качестве положительных контролей, а в качестве отрицательного контроля служила стерильная деионизированная вода.

Для статистической обработки данных была использована программа «R» («RStudio»). Для количественной оценки связи потенциально онкогенных МО с КРР определяли показатели отношения шансов (ОШ) и 95% доверительные интервалы (ДИ) к ним. Чувствительность, специфичность и ДИ были рассчитаны с помощью программы

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для идентификации потенциально онкогенных МО

Table 1. Nucleotide sequences of primers for identification of potentially oncogenic microorganisms

Детектируемый ген Target gene	Номер доступа в GenBank GenBank Accession number	Прямой праймер/обратный праймер Forward primer/reverse primer	Источник Source
Ген <i>clbA pks+</i> (поликетидсинтаза) <i>E. coli</i> The <i>clbA pks+</i> (polyketide synthase) gene of <i>E. coli</i>	CP155641.1	5'-CTCCACAGGAAGCTACTAAC-3' 5'-CGTGGTGATAAAGTTGGGAC-3'	[15]
Ген <i>clbB pks+</i> (поликетидсинтаза) <i>E. coli</i> The <i>clbB pks+</i> (polyketide synthase) gene of <i>E. coli</i>	CP155641.1	5'-GCAACATACTCGCCAGACT-3' 5'-TCTCAAGGCGTTGTTGTTG-3' probe FAM (5'-CAAGGTGCGCGCTAGGCTGT-3');	[16]
Ген фрагилизина (<i>bft</i>), синтезируемого энтеротоксигенным <i>B. fragilis</i> The fragilisin (<i>bft</i>) gene synthesized by enterotoxigenic <i>B. fragilis</i>	AF103902.1	5'-GAACCTAAAACGGTATATGT-3' 5'-GTTGTAGACATCCCACTGGC-3'	[15]
Ген адгезина <i>fadA F. nucleatum</i> <i>fadA</i> adhesion protein gene of <i>F. nucleatum</i>	DQ012973.1	5'-GCAGTTTCTGCTTCAGCATTT-3' 5'-TGCTTGAAGTCTTTGAGCTCTTT-3'	[17]
Ген биоплёнокообразования <i>fimA P. gingivalis</i> <i>fimA</i> gene for biofilm formation of <i>P. gingivalis</i>	AB195793.1	5'-TGCGACGCTATATGCAAGAC-3' 5'-TCTTCAAACACGCTGATG-3'	[17]



Распространённость потенциально онкогенных МО у пациентов с КРР на различных стадиях заболевания и в группах сравнения.

The prevalence of potentially oncogenic microorganisms in patients with CRC at various stages of the disease and in comparison groups.

«EpiTools»¹. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование образцов клинического материала методом ПЦР позволило определить частоты обнаружения генетических маркеров потенциально онкогенных МО у пациентов с КРР на различных стадиях заболевания и в группах сравнения (рисунк). У пациентов с КРР выявлена более высокая распространённость потенциально онкогенных маркеров по сравнению с пациентами с ВЗК и участниками контрольной группы. Прослеживается прямая связь между стадией онкологического заболевания и распространённостью потенциально онкогенных маркеров, в частности ДНК *F. nucleatum*, а также обращает на себя внимание более высокая частота обнаружения пародонтопатогенных МО на поздних стадиях онкологического процесса. На ранних стадиях опухоли преобладают колибактин-продуцирующие бактерии, несущие ген *clbB* острова патогенности *pks*.

В ходе исследования «случай–контроль» отмечена ассоциация отдельных потенциально онкогенных представителей микробиома кишечника с КРР (табл. 2). Так, наличие гена *bft* энтеротоксигенного *B. fragilis* значимо различается в группах пациентов с ВЗК и пациентов с КРР и ассоциировано с микробиомом пациентов с КРР (ОШ = 3,25; 95% ДИ 1,16–10,6; $p = 0,033$). Кроме того, обнаружена более высокая распространённость данного гена у пациентов с КРР по сравнению с пациентами с ВЗК, а в образцах от участников контрольной группы ген фрагилизина энтеротоксигенного *B. fragilis* не обнаружен.

По данным проведённого исследования установлено, что наличие ДНК пародонтопатогенного МО *F. nucleatum* ассоциировано с КРР, и частота её обнаружения различается в группе случаев и контрольных группах. У пациентов с ВЗК наличие ДНК другого пародонтопатогенного МО — *P. gingivalis* (ОШ = 7,75; 95% ДИ 2,03–50,9; $p = 0,009$) ассоциировано с КРР.

Частота идентификации ДНК *F. nucleatum* была выше у пациентов с КРР (44%) по сравнению с пациентами с ВЗК (22%) и участниками контрольной группы (5,3%). Была обнаружена высокая частота выявления ДНК *P. gingivalis* у пациентов с КРР (в 19% образцах) по сравнению с пациентами с ВЗК (в 2,9% образцах), ДНК *P. gingivalis* не обнаружена у участников контрольной группы.

В ходе исследования обнаружено, что наличие гена *clbB* острова патогенности *pks* энтеробактерий (ОШ = 5,47; 95% ДИ 1,49–20,14; $p = 0,015$) ассоциировано с КРР и позволяет отделить микробиом пациентов с этой патологией от микробиома участников контрольной группы. Детектируемый ген *clbB* острова патогенности *pks* энтеробактерий обнаружен в 19% образцах пациентов с КРР, в 8,6% — у пациентов с ВЗК, в 4% — у участников контрольной группы. Напротив, частота идентификации гена *clbA* не различалась в группах сравнения. Ген *clbA* выявлен в 10% образцах у пациентов с КРР, в 13% — у пациентов с ВЗК, в 4% — у участников контрольной группы.

У пациентов с КРР частота обнаружения маркеров потенциально онкогенных МО не зависела от локализации опухоли: детекция *F. nucleatum* в опухоли дистального расположения — в 14 случаях, проксимального расположения — в 15; *P. gingivalis* — в 5 и 7 случаях; гена *clbB* острова патогенности *pks* энтеробактерий — в 6 и 7 случаях; гена *clbA* — в 2 и

¹ EpiTools – Epidemiological Calculators.
URL: <http://epitools.ausvet.com.au>

Таблица 2. Представители кишечного микробиома, ассоциированные с КРР
Table 2. Representatives of the intestinal microbiome associated with CRC

Детектируемый ген Target gene	КРР, n (%) CRC, n (%)	ВЗК, n (%) IBD, n (%)	Контроль, n (%) Control, n (%)	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)			
				КРР/ВЗК CRC/IBD	КРР/контроль CRC/Control	КРР + ВЗК/контроль CRC + IBD/Control	КРР/ВЗК + контроль CRC/IBD + Control
Ген фрагилизина <i>bft</i> энтеротоксигенного <i>B. fragilis</i> Fragilisin <i>bft</i> gene of enterotoxigenic <i>B. fragilis</i>	14 (20%)	5 (7,1%)	0 (0%)	3,25 (1,16–10,6)	∞	∞	7 (2,55–22,5)
Ген адгезина <i>fadA</i> <i>F. nucleatum</i> <i>fadA</i> adhesion protein gene of <i>F. nucleatum</i>	31 (44%)	14 (20%)	4 (5,3%)	3,18 (1,52–6,9)	14,1 (5,13–50,1)	8,41 (2,89–24,46)	5,61 (2,87–11,3)
Ген биоплёнокообразования <i>fimA</i> <i>P. gingivalis</i> <i>fimA</i> gene for biofilm formation of <i>P. gingivalis</i>	13 (19%)	2 (2,9%)	0 (0%)	7,75 (2,03–50,9)	∞	∞	16,3 (4,33–106)
Ген <i>clbA</i> острова патогенности <i>pkS</i> <i>E. coli</i> The gene <i>clbA</i> of the <i>pkS</i> pathogenicity island of <i>E. coli</i>	7 (10%)	9 (13%)	3 (4,0%)	0,75 (0,25–2,15)	2,67 (0,71–12,8)	3,09 (0,87–10,99)	1,23 (0,44–3,21)
Ген <i>clbB</i> острова патогенности <i>pkS</i> <i>E. coli</i> The gene <i>clbB</i> of the <i>pkS</i> pathogenicity island of <i>E. coli</i>	13 (19%)	6 (8,6%)	3 (4,0%)	2,43 (0,9–7,31)	5,47 (1,49–20,14)	3,77 (1,08–13,18)	3,44 (1,39–8,51)

Примечание. ∞ — в связи с нулевым значением знаменателя рассчитатель показателя ОШ не представляется возможным.
Note. ∞ — due to the zero value of the denominator, it is not possible to calculate the OR indicator.

5 случаях; гена фрагилизина *bft* энтеротоксигенного *B. fragilis* — в 6 и 7 случаях соответственно. Не выявлено значимых различий, связанных с морфологическим типом опухоли (обнаружение *F. nucleatum* в 18 случаях высокодифференцированной опухоли, в 13 случаях низкодифференцированной опухоли; *P. gingivalis* — в 6 и 7 случаях; гена *clbB* острова патогенности *pkS* энтеробактерий — в 7 и 6 случаях; гена *clbA* — в 4 и 3 случаях; гена фрагилизина *bft* энтеротоксигенного *B. fragilis* — в 6 и 8 соответственно). Таким образом, детекция маркеров потенциально онкогенных МО позволяет различать КРР вне зависимости от локализации и морфологического типа опухоли.

С учётом полученных данных, нами рассчитаны показатели чувствительности и специфичности диагностического теста, позволяющего различить микробиомы пациентов с КРР и микробиомы пациентов с ВЗК и участников контрольной группы при отдельном и совместном обнаружении генетических детерминант потенциально онкогенных МО (табл. 3). Оптимальным (по сочетанию чувствительности и специфичности) представляется вариант тестирования, при котором учитывается факт идентификации ДНК хотя бы 1 из 5 потенциальных микробных онкомаркеров.

Обсуждение

В настоящем исследовании мы оценили распространённость потенциально онкогенных МО, ассоциированных с КРР, среди жителей российского мегаполиса с диагностированными КРР, ВЗК и лиц без патологии кишечника тракта.

Известно, что *B. fragilis* является комменсальным представителем микробиоты кишечника. В желудочно-кишечном тракте представлены как нетоксигенные штаммы *B. fragilis* (не связанные с КРР) [18], так и энтеротоксигенные *B. fragilis*, синтезирующие фрагилизин — токсин, который расщепляет белок клеточной адгезии Е-кадгерин, нарушая кишечный барьер и способствуя развитию диареи [19]. Кроме того, данный токсин может активировать реализацию сигнального пути Wnt/β-катенина, способствуя пролиферации клеток, индукции выработки медиаторов воспаления и канцерогенезу [20]. Токсин *B. fragilis* кодируется геном *bft* с 3 изоформами (*bft 1*, *bft 2*, *bft 3*), который расположен на острове патогенности (PAI) и фланкирован генами, кодирующими белки мобилизации и представляющими собой последовательности конъюгативных транспозонов CTn86 и CTn9343. Нетоксигенные штаммы *B. fragilis* не обладают островом патогенности, но при наличии конъюгативных транспозонов у некоторых штаммов PAI может переходить от энтеротоксигенного *B. fragilis* к нетоксигенным штаммам *B. fragilis* [21]. Установлена роль энтеротоксигенного *B. fragilis* в качестве «во-

Таблица 3. Характеристика чувствительности и специфичности идентификации потенциально онкогенных МО для диагностики КРР**Table 3.** Characterization of sensitivity and specificity of identification of potentially oncogenic microorganisms for the diagnosis of CRC

Параметр метода диагностики Parameter of the diagnostic method	КРР, <i>n</i> CRC, <i>n</i>	ВЗК + контроль, <i>n</i> IBD + control, <i>n</i>	Чувствительность, % (95% ДИ) Sensitivity, % (95% CI)	Специфичность, % (95% ДИ) Specificity, % (95% CI)
Обнаружение гена <i>clbA</i> Detection of the <i>clbA</i> gene	7	11	10 (5–19)	92 (86–95)
Обнаружение гена фрагилизина <i>bft</i> энтеротоксигенного <i>B. fragilis</i> Detection of the fragilisin <i>bft</i> gene of enterotoxigenic <i>B. fragilis</i>	14	5	20 (12–31)	97 (92–99)
Обнаружение гена адгезина <i>fadA</i> <i>F. nucleatum</i> Detection the <i>fadA</i> adhesion protein gene of <i>F. nucleatum</i>	31	18	44 (33–56)	88 (81–92)
Обнаружение гена биоплёнко-образования <i>fimA</i> <i>P. gingivalis</i> Detection the <i>fimA</i> gene for biofilm formation of <i>P. gingivalis</i>	13	2	19 (11–29)	99 (95–99)
Обнаружение гена <i>clbB</i> Detection of the <i>clbB</i> gene	13	9	19 (11–29)	94 (89–97)
Обнаружение 1 и более МО Detection of 1 or more microorganisms	36	27	51 (39–64)	81 (74–87)
Обнаружение 2 и более МО Detection of 2 or more microorganisms	22	10	31 (21–44)	93 (88–97)
Обнаружение 3 и более МО Detection of 3 or more microorganisms	12	4	17 (9–28)	97 (93–99)
Обнаружение 4 и более МО Detection of 4 or more microorganisms	6	3	9 (3–18)	98 (94–100)
Обнаружение 5 и более МО Detection of 5 or more microorganisms	2	2	3 (0,35–10,00)	99 (95–100)

дителя» в модели «водитель–пассажир», которая заключается в повреждении бактериями-«водителями» эпителиальной ДНК, что приводит к развитию канцерогенеза и изменению микробного сообщества, далее в процессе онкогенеза «водители» вытесняются комменсальными бактериями-«пассажирами», обладающими стимулирующими опухоль свойствами [22]. Энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis* способны ингибировать экзосомальную микроРНК miR-149-3р, опосредующую межклеточные взаимодействия путём модуляции дифференцировки клеток Th17, способствуя воспалению и канцерогенезу в кишечнике [23].

Выявленная в ходе нашего исследования ассоциация энтеротоксигенного *B. fragilis* с КРР подтверждена в разных этнических когортах. К примеру, в популяции жителей Ирана частота детекции гена *bft* в биопсийных образцах толстой кишки пациентов с КРР варьировала от 30,5 до 47% по сравнению с участниками контрольной группы — до 6,25% биопсийных образцов [24, 25]. При этом среди пациентов из Тегерана с язвенным колитом обнаружена более высокая распространённость энтеротоксигенного *B. fragilis* в образцах биопсии по сравнению с лицами без патологии кишечника [26]. В канадской и французской когортах пациентов с

КРР была выявлена высокая распространённость энтеротоксигенного *B. fragilis* (до 32% образцах) по сравнению с лицами контрольной группы [15, 19]. Результаты европейского проспективного исследования питания и рака (EPIC) показали, что в европейской когорте IgA- и IgG-серопозитивность к энтеротоксигенному *B. fragilis* и генотоксичной *E. coli* была значимо связана с развитием КРР [27].

F. nucleatum является грамотрицательным неспорообразующим облигатным анаэробным МО семейства *Fusobacteriaceae* и доминирующим МО в биоплёнках зубного налёта [28]. *F. nucleatum* способствует канцерогенезу и метастазированию посредством множества механизмов: способствует размножению миелоидных супрессорных клеток; ускоряет апоптоз Т-клеток, подавляет пролиферацию Т-клеток, тем самым организуя микроокружение опухоли, способствующее онкогенезу и метастазированию; вызывает экспрессию белка молекулярной структуры S100A9 и запускает активацию макрофагов M2 посредством ядерного фактора-κВ, тем самым активизируя пролиферацию и миграцию опухолевых клеток; стимулирует пролиферацию регуляторных Т-клеток Foxp3⁺ и ингибирование пролиферации и функции эффекторных Т-клеток, препятствуя противоопухолевому иммунному от-

вету; вызывает секрецию циркулирующих экзосом, усиливая инвазию опухоли; кроме того, описана возможная роль *F. nucleatum* в резистентности при иммунотерапии и химиотерапии опухолей [29]. Ключевым фактором вирулентности/онкогенности *F. nucleatum* является адгезин FadA, регулирующий экспрессию аннексина A1 посредством E-кадгерина. Индукция аннексина A1, являющегося модулятором Wnt/ β -катенина, специфически стимулирует клетки колоректальной карциномы, способствуя прогрессированию КРР [30]. Кроме того, *F. nucleatum* стимулирует воспалительные и антиапоптотические реакции в клетках КРР посредством высвобождения АДФ-гептозы и активации оси ALPK1/TIFA [31]. Недавно охарактеризована отдельная клада Fna C2 *F. nucleatum*, ассоциированная с КРР, которая обладает повышенной вирулентностью [32].

По мнению J. Jones и соавт., именно *F. nucleatum* и энтеротоксигенный *B. fragilis* представляют собой два ключевых патобионта, способствующих онкогенному перепрограммированию эпителиальных клеток кишечника [11].

P. gingivalis является анаэробной бактерией полости рта, вызывающей хронический пародонтит. За последнее десятилетие выявлены механизмы, с помощью которых *P. gingivalis* способствует прогрессированию опухоли, стимулирует клеточную инвазию и метастазирование опухолевых клеток. Данные механизмы включают усиление экспрессии провоспалительных факторов и матриксных металлопротеиназ, которые разрушают базальные мембраны и внеклеточный матрикс эпителия кишечника [33].

По данным исследований обнаружена связь между наличием пародонтопатогенных бактерий в образцах фекалий и биопсийном материале с КРР. В исследовании «случай–контроль» с использованием метагеномного секвенирования выявлено, что частота детекции *Fusobacterium* была выше у больных КРР (31,9% против 11,7% у контрольной группы) и развитие КРР связано с наличием *F. nucleatum* (ОШ = 4,11; 95% ДИ 1,62–10,47; $p = 0,004$) и *P. gingivalis* (ОШ = 5,17; 95% ДИ 1,75–15,25; $p = 0,001$) [34]. В проведённом во Франции исследовании выявлено, что распространённость *F. nucleatum* среди пациентов с КРР (70,4%) была выше по сравнению с лицами без патологии кишечника [19].

P. gingivalis и *F. nucleatum*, бактерии полости рта, относящиеся к так называемым «красному» и «оранжевому» комплексам, способны не только индуцировать хроническое воспаление, но и способствовать онкогенезу как в полости рта, так и в кишечнике, обладая, возможно, синергетическим действием [35].

Следует также отметить, что все три онкогенные бактерии (*F. nucleatum*, *B. fragilis* и *P. gingivalis*) потенциально связаны не только с развитием КРР,

но и с худшим прогнозом для пациентов (более низкой выживаемостью) [13, 14]. Кроме того, результаты нашего исследования свидетельствуют о наличии прямой связи между стадией онкологического процесса и распространённостью пародонтопатогенных МО *F. nucleatum* и *P. gingivalis*.

Различными авторами также обнаружена связь колибактин-продуцирующих генотипов энтеробактерий с КРР. Колибактин — генотоксин, вызывающий двухцепочечные разрывы ДНК, остановку клеточного цикла, хромосомную нестабильность в эукариотических клетках. Он синтезируется сборочной линией нерибосомной поликетидсинтазы (*pkS*), состоящей из 19 генов (от *clbA* до *clbS*), расположенных на геномном острове размером 54 т. п. н. [36]. Островок *pkS* присутствует в геномах *K. pneumoniae*, *K. aerogenes* (базоним: *Enterobacter aerogenes*), *Citrobacter koseri*, в филогенетических группах *E. coli* [19]. Инфицирование может происходить на ранних этапах онтогенеза: известно, что передача колибактин-продуцирующих генотипов энтеробактерий происходит в перинатальном периоде при прохождении через родовые пути (ген *clbB* выявлен у 87,5% детей, родившихся естественным путём, у 12,5% — путём кесарева сечения) и в результате грудного вскармливания [37]. Частота детекции гена *clbN* была выше у пациентов с КРР (49,4%) по сравнению с участниками контрольной группы (24%; $p < 0,005$), при этом высокая распространённость (72,2%) обнаружена на последней стадии (IV) по сравнению с КРР стадии I/II (42,3%; $p < 0,05$) и КРР III стадии (43,2%; $p < 0,05$) [19]. В исследовании на японской когорте (543 случаев колоректальной неоплазии (22 КРР и 521 аденома), 425 участников контрольной группы) *pkS*⁺-*E. coli* обнаружена в 32,6% образцах фекалий у пациентов с колоректальной неоплазией и в 30,8% — у участников контрольной группы [38]. Также среди канадской когорты обнаружено, что частота колонизации бактериями *pkS*⁺ не различалась среди участников контрольной группы (42%) и пациентов с КРР (46%), примечательно, что *pkS*⁺-бактерии были распространены на поздних стадиях КРР (40/79; 52%) по сравнению с ранней стадией опухоли (3/15; 20%; $p < 0,05$) [15]. В когортном исследовании *pkS*⁺-*E. coli* обнаружена в 9,44% (111/1175) биопсийных образцах пациентов с КРР, при этом ДНК *pkS*⁺-*E. coli* обратно пропорционально связано со стадией опухолевого процесса ($p = 0,008$) [16]. В ходе нашего исследования выявлена высокая распространённость гена *clbB* острова патогенности *pkS*⁺-*E. coli* на I стадии онкологического процесса.

Заключение

Результаты проведённого исследования позволяют заключить, что КРР у пациентов крупного мегаполиса ассоциирован с наличием в составе

кишечного микробиома генов потенциально онкогенных бактерий, в частности видоспецифических генов пародонтопатогенов *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, гена токсина-фрагилизина *bft* *B. fragilis*, гена поликетидсинтазы *clbB* острова патогенности *pks* энтеробактерий. Полученные результаты согласуются с современными представлениями о патогенетической роли этих бактерий и/или их токсинообразующих штаммов при КРР.

Молекулярно-генетическая детекция вышеуказанных генетических детерминант потенциально онкогенных МО может быть применена в качестве метода неинвазивной диагностики КРР вне зависимости от локализации и морфологического типа опухоли как отдельно, так и совместно с другими рекомендованными тестами.

С учётом имеющихся данных о связи данных бактерий со стадийностью/прогрессированием КРР, прогнозом/выживаемостью и резистентностью к иммунотерапии и химиотерапии, можно предположить возможность их использования в качестве неинвазивных биомаркеров для прогнозирования течения и исходов КРР, ответа на противоопухолевую терапию, а в перспективе для разработки соответствующих онкопрофилактических мероприятий, включая персонифицированную коррекцию дисбиоза полости рта и кишечника и/или их санацию.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Baidoun F., Elshiyw K., Elkeraie Y., et al. Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes. *Curr. Drug Targets*. 2021;22(9):998–1009. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389450121999201117115717>
- Patel S.G., Karlitz J.J., Yen T., et al. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection. *Lancet Gastroenterol. Hepatol*. 2022;7(3):262–74. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00426-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00426-X)
- Giorgi Rossi P., Vicentini M., Sacchetti C., et al. Impact of screening program on incidence of colorectal cancer: a cohort study in Italy. *Am. J. Gastroenterol*. 2015;110(9):1359–66. DOI: <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.240>
- Fitzpatrick-Lewis D., Ali M.U., Warren R., et al. Screening for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Colorectal Cancer*. 2016;15(4):298–313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.03.003>
- Niedermaier T., Tikk K., Gies A., et al. Sensitivity of fecal immunochemical test for colorectal cancer detection differs according to stage and location. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2020;18(13):2920–8.e6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.01.025>
- Шумилова В.Н., Гончаров А.Е., Латария Э.Л., Асланов Б.И. Роль кишечной микробиоты в диагностике колоректального рака. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2024;9(1):112–23. Shumilova V.N., Goncharov A.E., Latariya E.L., Aslanov B.I. The role of the gut microbiota in the development of colorectal cancer. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2024;9(1):112–23. DOI: <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-1-112-123> EDN: <https://elibrary.ru/mzdotq>
- Костин Р.К., Мальногин Д.А., Соленова Л.Г., Кулаева Е.Д. Микробиота желудочно-кишечного тракта и канцерогенез в различных органах человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(1):110–25. Kostin R.K., Malyugin D.A., Solenova L.G., Kulaeva E.D. Gut microbiota and carcinogenesis in various human organs. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(1):110–25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-310> EDN: <https://elibrary.ru/cybybs>
- Zeller G., Tap J., Voigt A.Y., et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol. Syst. Biol*. 2014;10(11):766. DOI: <https://doi.org/10.15252/msb.20145645>
- Liang J.Q., Li T., Nakatsu G., et al. A novel faecal *Lachnospiridium* marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer. *Gut*. 2020;69(7):1248–57. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318532>
- Baxter N.T., Ruffin M.T. 4th, Rogers M.A., Schloss P.D. Microbiota-based model improves the sensitivity of fecal immunochemical test for detecting colonic lesions. *Genome Med*. 2016;8(1):37. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0290-3>
- Jones J., Shi Q., Nath R.R., Brito I.L. Keystone pathobionts associated with colorectal cancer promote oncogenic reprogramming. *PLoS One*. 2024;19(2):e0297897. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297897>
- Dougherty M.W., Jobin C. Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. *Gut Microbes*. 2023;15(1):2185028. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185028>
- Wei Z., Cao S., Liu S., et al. Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget*. 2016;7(29):46158–72. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10064>
- Kerdreux M., Edin S., Löwenmark T., et al. *Porphyromonas gingivalis* in colorectal cancer and its association to patient prognosis. *J. Cancer*. 2023;14(9):1479–85. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.83395>
- Oliero M., Hajjar R., Cuisiniere T., et al. Prevalence of pks + bacteria and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with colorectal cancer. *Gut Pathog*. 2022;14(1):51. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-022-00523-y>
- Arima K., Zhong R., Ugai T., et al. Western-style diet, pks Island-carrying *Escherichia coli*, and colorectal cancer: analyses from two large prospective cohort studies. *Gastroenterology*. 2022;163(4):862–74. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.06.054>
- de la Fuente C., Flores S., Moraga M. DNA from human ancient bacteria: a novel source of genetic evidence from archaeological dental calculus. *Archaeometry*. 2013;55(4):767–78. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2012.00707.x>
- Chan J.L., Wu S., Geis A.L., et al. Non-toxicigenic *Bacteroides fragilis* (NTBF) administration reduces bacteria-driven chronic colitis and tumor development independent of polysaccharide A. *Mucosal Immunol*. 2019;12(1):164–77. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0085-5>
- Périchon B., Lichtl-Häfele J., Bergsten E., et al. Detection of *Streptococcus gallolyticus* and four other CRC-associated bacteria in patient stools reveals a potential "driver" role for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2022;12:794391. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.794391>
- Sears C.L., Geis A.L., Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *J. Clin. Invest*. 2014;124(10):4166–72. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI172334>
- Buckwold S.L., Shoemaker N.B., Sears C.L., Franco A.A. Identification and characterization of conjugative transposons CTn86 and CTn9343 in *Bacteroides fragilis* strains. *Appl. Environ. Microbiol*. 2007;73(1):53–63. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01669-06>

22. Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R., Dutilh B.E. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10(8):575–82. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>
23. Cao Y., Wang Z., Yan Y., et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* promotes intestinal inflammation and malignancy by inhibiting exosome-packaged miR-149-3p. *Gastroenterology.* 2021;161(5):1552–66.e12. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.08.003>
24. Jasemi S., Emancini M., Fazeli M.S., et al. Toxigenic and non-toxigenic patterns I, II and III and biofilm-forming ability in *Bacteroides fragilis* strains isolated from patients diagnosed with colorectal cancer. *Gut Pathog.* 2020;12:28. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00366-5>
25. Zamani S., Taslimi R., Sarabi A., et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a possible etiological candidate for bacterially-induced colorectal precancerous and cancerous lesions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;9:449. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00449>
26. Zamani S., Hesam Shariati S., Zali M.R., et al. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with ulcerative colitis. *Gut Pathog.* 2017;9:53. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0202-0>
27. Butt J., Jenab M., Werner J., et al. Association of pre-diagnostic antibody responses to *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* toxin proteins with colorectal cancer in a European cohort. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1–14. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1903825>
28. Signat B., Roques C., Poulet P., Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2011;13(2):25–36. DOI: <https://doi.org/10.21775/cimb.013.025>
29. Ye C., Liu X., Liu Z., et al. *Fusobacterium nucleatum* in tumors: from tumorigenesis to tumor metastasis and tumor resistance. *Cancer Biol. Ther.* 2024;25(1):2306676. DOI: <https://doi.org/10.1080/15384047.2024.2306676>
30. Rubinstein M.R., Baik J.E., Lagana S.M., et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ β -catenin modulator Annexin A1. *EMBO Rep.* 2019;20(4):e47638. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.201847638>
31. Martin-Gallausiaux C., Salesse L., Garcia-Weber D., et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes inflammatory and anti-apoptotic responses in colorectal cancer cells via ADP-herpocytose release and ALPK1/TIFA axis activation. *Gut Microbes.* 2024;16(1):2295384. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2295384>
32. Zepeda-Rivera M., Minot S.S., Bouzek H., et al. A distinct *Fusobacterium nucleatum* clade dominates the colorectal cancer niche. *Nature.* 2024;628(8007):424–32. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07182-w>
33. Chang C., Wang H., Liu J., et al. Porphyromonas gingivalis infection promoted the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells through the miR-21/PDCD4/AP-1 negative signaling pathway. *ACS Infect. Dis.* 2019;5(8):1336–47. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.9b00032>
34. Ahn J., Sinha R., Pei Z., et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 2013;105(24):1907–11. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djt300>
35. Леонов Г.Е., Вараева Ю.Р., Ливанцова Е.Н., Стародубова А.В. Особенности микробиома ротовой полости при различных соматических заболеваниях. *Вопросы питания.* 2023;92(4):6–19. Leonov G.E., Vараева Yu.R., Livantsova E.N., Starodubova A.V. The oral microbiome in the context of systemic disease. *Problems of Nutrition.* 2023;92(4):6–19. DOI: <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-4-6-19>
36. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., et al. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(12):3906–11. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00949-08>
37. Tsunematsu Y., Hosomi K., Kunisawa J., et al. Mother-to-infant transmission of the carcinogenic colibactin-producing bacteria. *BMC Microbiol.* 2021;21(1):235. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02292-1>
38. Iwasaki M., Kanehara R., Yamaji T., et al. Association of *Escherichia coli* containing polyketide synthase in the gut microbiota with colorectal neoplasia in Japan. *Cancer Sci.* 2022;113(1):277–86. DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.15196>

Информация об авторах

Шумилова Виктория Николаевна[✉] — аспирант каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, врач-эпидемиолог эпидемиологического отдела СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, tori.lovass@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0004-4271-6530>

Гончаров Артемий Евгеньевич — д. м. н., зав. лаб. функциональной геномики и протеомики микроорганизмов Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5206-6656>

Азаров Даниил Валерьевич — к. м. н., ассистент каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; н. с. лаб. функциональной геномики и протеомики микроорганизмов Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2483-5144>

Ситкин Станислав Игоревич — к. м. н., зав. научно-исследовательской группы эпигенетики и метагеномики Института перинатологии и педиатрии Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия; доцент каф. пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М. Рысса СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; в. н. с. Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0331-0963>

Патария Элеуджа Лаурентьевич — к. м. н., доцент каф. факультетской хирургии им. И.И. Грекова, проректор по клинической работе СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9569-8485>

Information about the authors

Viktoriya N. Shumilova[✉] — postgraduate student, Department of epidemiology, parasitology and disinfectology, epidemiologist, Epidemiological department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, tori.lovass@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0004-4271-6530>

Artemij E. Goncharov — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of functional genomics and proteomics of microorganisms, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; Professor, Department of epidemiology, parasitology and disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5206-6656>

Daniil V. Azarov — Cand. Sci. (Med.), assistant, Department of epidemiology, parasitology and disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia; research associate, Laboratory of functional genomics and proteomics of microorganisms, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2483-5144>

Stanislav I. Sitkin — Cand. Sci. (Med.), Head, Epigenetics & metagenomics research group, Institute of Perinatology and Pediatrics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia; Associate Professor, Department of propaedeutics of internal diseases, gastroenterology and dietetics named after S.M. Ryss, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia; leading researcher, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0331-0963>

Elgudzha L. Latariya — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of faculty surgery named after I.I. Grekov, Vice-rector for clinical work, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9569-8485>

Асланов Батырбек Исмелович — д. м. н., доцент, зав. каф. эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии; зав. научно-исследовательской лабораторией молекулярной эпидемиологии и исследования бактериофагов СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6890-8096>

Бобраков Михаил Анатольевич — врач-хирург, онколог, ассистент каф. госпитальной хирургии им. В.А. Опделя СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-3003-8886>

Топузов Рустем Эльдарович — к. м. н., врач-хирург, онколог, доцент каф. госпитальной хирургии им. В.А. Опделя СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8168-6187>

Участие авторов: *Шумилова В.Н.* — методология и дизайн исследования, статистический анализ, сбор клинического материала, написание и редактирование рукописи; *Гончаров А.Е.* — методология и дизайн исследования, написание и редактирование рукописи; *Азаров Д.В.* — статистический анализ, написание и редактирование рукописи; *Ситкин С.И.* — написание и редактирование рукописи; *Латария Э.Л., Асланов Б.И., Бобраков М.А., Топузов Р.Э.* — редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 18.07.2024;
принята к публикации 12.09.2024;
опубликована 29.10.2024

Batyrbek I. Aslanov — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of epidemiology, parasitology and disinfectology; Head, Research laboratory of molecular epidemiology and bacteriophage research, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6890-8096>

Mikhail A. Bobrakov — surgeon, oncologist, assistant, Department of hospital surgery named after V.A. Ooppel, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-3003-8886>

Rustem E. Topuzov — Cand. Sci. (Med.), surgeon, oncologist, Associate Professor, Department of hospital surgery named after V.A. Ooppel, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8168-6187>

Author contribution: *Shumilova V.N.* — study methodology and design, statistical analysis, collection of clinical material, writing and editing of the manuscript; *Goncharov A.E.* — study methodology and design, writing and editing of the manuscript; *Azarov D.V.* — statistical analysis, writing and editing of the manuscript; *Sitkin S.I.* — writing and editing of the manuscript; *Latariya E.L., Aslanov B.I., Bobrakov M.A., Topuzov R.E.* — editing of the manuscript. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the 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 18.07.2024;
accepted for publication 12.09.2024;
published 29.10.2024



Анализ эпидемий гриппа на фоне пандемии COVID-19 с использованием усовершенствованной системы надзора (с 2021 по 2024 год)

Карпова Л.С.[✉], Пелих М.Ю., Столяров К.А., Волик К.М., Столярова Т.П., Даниленко Д.М.

Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Цель работы — оценка эффективности новых базовых линий (БЛ) и порогов интенсивности (ПИ) эпидемий по заболеваемости и госпитализации с диагнозом «грипп» для уточнения сроков эпидемий и их распространения по территории России на фоне пандемии COVID-19 (с 2021 по 2024 г.).

Материалы и методы. В НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева проведено реформирование программного обеспечения с учётом необходимости решения поставленных задач в период пандемии COVID-19. В связи с изменениями в надзоре за гриппом в отношении постановки диагноза «грипп» и увеличением регистрации случаев заболеваний, были откорректированы БЛ и ПИ эпидемий по заболеваемости гриппом и частоте госпитализаций в наблюдаемом 61 городе и для каждого федерального округа (по всему населению и по возрастным группам) за 3 эпидемии на фоне пандемии COVID-19 (2021–2022, 2022–2023 и 2023–2024 гг.).

Результаты. Сравнение БЛ, рассчитанных за предыдущие 6 сезонов по заболеваемости и частоте госпитализаций, в основном клинически диагностированным гриппом, и новых БЛ заболеваемости и госпитализации, в основном лабораторно подтверждённым гриппом в период пандемии, показало незначительные изменения в показателях БЛ заболеваемости и госпитализаций, а ПИ эпидемий по этим показателям увеличились.

Заключение. На фоне пандемии COVID-19 в сезон 2020–2021 гг. эпидемии гриппа не было. В 2021–2022 гг. эпидемия гриппа А(Н3N2) была низкой интенсивности по заболеваемости, частоте госпитализации и низкой летальности (2 случая). В 2022–2023 гг. эпидемия гриппа А(Н1N1)pdm09 и В была средней интенсивности по заболеваемости с высокой частотой госпитализаций и летальностью (120 случаев). Эпидемия гриппа А(Н3N2) и В в 2023–2024 гг. по интенсивности заболеваемости была очень высокого уровня, но средней по частоте госпитализаций и летальности (41 случай), а заболеваемость, по сравнению с предыдущей эпидемией, была больше (0,28 и 0,19% всего населения), в том числе лиц старше 15 лет (0,19 и 0,12%).

Ключевые слова: грипп, COVID-19, базовые линии, пороги интенсивности, заболеваемость, госпитализация, летальность

Благодарность. Приносим искреннюю благодарность сотрудникам территориальных управлений Роспотребнадзора за плодотворное сотрудничество.

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: Карпова Л.С., Пелих М.Ю., Столяров К.А., Волик К.М., Столярова Т.П., Даниленко Д.М. Анализ эпидемий гриппа на фоне пандемии COVID-19 с использованием усовершенствованной системы надзора (с 2021 по 2024 год). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):679–691.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-556>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-556>

Analysis of influenza epidemics during the COVID-19 pandemic using an improved surveillance system (from 2021 to 2024)

Ludmila S. Karpova[✉], Maria Yu. Pelikh, Kirill A. Stolyarov, Ksenia M. Volik, Tatyana P. Stolyarova, Daria M. Danilenko

Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

Abstract

Aim. Assessing the effectiveness of new baselines and intensity thresholds of epidemics based on rates of incidence and hospitalization with a diagnosis of “influenza” to clarify the timing of epidemics and their spread throughout the Russian Federation against the backdrop of the COVID-19 pandemic (from 2021 to 2024).

Materials and methods. At the A.A. Smorodintsev Influenza Research Institute, the software was reformed taking into account the need to solve the tasks set during the COVID-19 pandemic. Due to changes in influenza surveillance in relation to the diagnosis of “influenza”, and hence the increase in the registration of influenza cases, the baseline and threshold of epidemics were adjusted for the influenza incidence and hospitalization rates in the surveyed cities in total (61) and for each Federal districts (over the entire population and by age groups) for 3 epidemics against the background of COVID-19 pandemic (2021–2022, 2022–2023, and 2023–2024).

Results. A comparison of baselines calculated over the previous 6 seasons based on the incidence and hospitalization rates of mostly clinically diagnosed influenza and new baseline levels of incidence and hospitalization rates of mostly laboratory-confirmed influenza during the pandemic showed minor changes in the indicators of baseline incidence and hospitalization rates while epidemic thresholds for these indicators increased.

Conclusion. Against the backdrop of the COVID-19 pandemic during the 2020–2021 season, there was no influenza epidemic. In 2021–2022, the A(H3N2) epidemic was of low intensity in terms of incidence, hospitalization rates and low mortality (2 cases). In 2022–2023, the influenza A(H1N1)pdm09 and B epidemic was of moderate intensity in terms of incidence, with a high frequency of hospitalizations and mortality (120 cases). Influenza A(H3N2) and B epidemic in 2023–2024 was of a “very high” level in terms of the influenza incidence, but average in terms of the frequency of hospitalizations and mortality (41 cases), with higher incidence rate compared to the previous epidemic (0.28% and 0.19% of the total population), including persons over 15 years of age (0.19% and 0.12%).

Keywords: *influenza, COVID-19, baselines, intensity thresholds, morbidity, hospitalization, mortality*

Acknowledgement. We express our sincere gratitude to the staff of the territorial offices of Rospotrebnadzor for their fruitful cooperation.

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: Karpova L.S., Pelikh M.Yu., Stolyarov K.A., Volik K.M., Stolyarova T.P., Danilenko D.M. Analysis of influenza epidemics during the COVID-19 pandemic using an improved surveillance system (from 2021 to 2024). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2024;101(5):679–691.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-556>

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

Введение

В течение последних 4 сезонов в России наблюдается циркуляция новой коронавирусной инфекции. На этом фоне для точного определения старта эпидемии в стране необходимо использовать данные заболеваемости только гриппом без учёта острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ), поскольку данные заболеваемости ОРВИ и COVID-19, значительно превосходящие грипп по численности в период пандемии, маскируют место, время старта и характер развития эпидемии гриппа. В связи со схожестью клинического течения гриппа, COVID-19 и других ОРВИ, согласно Постановлению Правительства от 14.12.2022

№ 2297, тестирование на вирусы гриппа и других ОРВИ в больницах и поликлиниках проводится в рамках программы государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи и одновременно с тестом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на коронавирус¹.

Цель работы — оценка эффективности новых базовых линий (БЛ) и порогов интенсивности (ПИ)

¹ Постановление Правительства РФ от 14.12.2022 № 2297 «О внесении изменений в раздел IV Программы государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2022 год и на плановый период 2023 и 2024 годов» (номер опубликования: 0001202212150010).

эпидемий по заболеваемости и госпитализации с диагнозом «грипп» для уточнения сроков эпидемий и их распространения по территории России на фоне пандемии COVID-19 (с 2021 по 2024 г.).

Материалы и методы

На базе НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева было проведено реформирование программного обеспечения с учётом необходимости решения поставленных задач в период пандемии COVID-19. Внедрение новой электронной системы, построенной на основе создания гибкой платформы, позволило оперативно реагировать путём изменения или добавления электронных форм на требования к сбору и анализу данных и выгрузку результатов в глобальную базу данных ВОЗ [1].

Ранее нами были рассчитаны БЛ и ПИ заболеваемости гриппом за 6 сезонов (с 2016–2017 по 2022–2023 гг.) по методу движущихся эпидемий, принятому в европейской системе надзора за гриппом [2, 3]. В связи с изменениями в надзоре за гриппом в отношении постановки диагноза «грипп» и других ОРВИ, а отсюда увеличением регистрации случаев заболеваний гриппом были откорректированы БЛ и ПИ эпидемий по заболеваемости гриппом и частоте госпитализаций с диагнозом «грипп» в наблюдаемых городах (в сумме 61) и для каждого федерального округа (ФО) (по всему населению и по возрастным группам) за 3 эпидемии, протекающие на фоне пандемии COVID-19 (2021–2022, 2022–2023 и 2023–2024 гг.).

Статистическая обработка результатов проведена в программе «MS Excel» с применением t-критерия Стьюдента, при значимости $p = 95\%$.

Результаты и обсуждение

Сравнение БЛ, рассчитанных за предыдущие 6 сезонов по заболеваемости и частоте госпитализаций, в основном клинически диагностированным гриппом, и новых БЛ заболеваемости и госпитализации, в основном лабораторно подтверждённым гриппом в период пандемии, показало незначительные изменения в показателях БЛ заболеваемости и госпитализаций, а ПИ эпидемий по этим показателям увеличились (табл. 1, 2).

Мониторинг заболеваемости гриппом в стране в сезон 2023–2024 гг. показал её ранний рост: уже на 45-й неделе 2023 г. (2-я неделя ноября) в целом по стране она превысила БЛ (0,04 на 10 тыс. населения) на 87,5%. Далее наблюдали неуклонный рост заболеваемости гриппом в течение 6 нед с пиком (4,52 на 10 000 населения) на 51-й неделе 2023 г. Со следующей недели заболеваемость стала снижаться, но оставалась на низком уровне до 18-й недели. Показатель заболеваемости на пике эпидемии (2023–2024 гг.) был в 2,5 раза выше эпидемии 2022–2023 гг. Интенсивность эпидемии гриппа последнего сезона была очень высокого уровня, в предыдущую эпидемию — среднего уровня (рис. 1).

Мониторинг развития заболеваемости в разных возрастных группах населения

В сезоне 2023–2024 гг. заболеваемость гриппом превысила БЛ на 45-й неделе одновременно во всех возрастных группах. Пик заболеваемости был зарегистрирован на 51-й неделе одновременно в детских возрастных группах и среди лиц старше 15 лет. Интенсивность заболеваемости гриппом на

Таблица 1. БЛ и ПИ заболеваемости гриппом на 10 тыс. населения
Table 1. Baselines and thresholds of influenza incidence rate, per 10,000

Показатель Parameter		2016–2017 – 2022–2023					2021–2022 – 2023–2024				
		всего total	возраст, лет age, years				всего total	возраст, лет age, years			
			0–2	3–6	7–14	15+		0–2	3–6	7–14	15+
Россия Russia											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,05	0,23	0,13	0,08	0,04	0,04	0,23	0,13	0,05	0,03
	постэпидемические post-epidemic	0,04	0,21	0,17	0,09	0,04	0,05	0,28	0,19	0,10	0,04
ПИ IT	средний medium	0,36	1,32	1,40	0,72	0,21	0,92	3,87	3,84	2,60	0,40
	высокий high	1,12	5,39	4,38	2,35	0,65	2,95	9,83	9,28	6,91	1,92
	очень высокий very high	1,46	7,20	5,69	3,07	0,84	3,85	12,47	11,69	8,81	2,59
Центральный ФО Central Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,06	0,24	0,24	0,13	0,03	0,05	0,20	0,13	0,07	0,05
	постэпидемические post-epidemic	0,03	0,12	0,12	0,05	0,02	0,05	0,11	0,16	0,08	0,02
ПИ IT	средний medium	0,15	0,57	1,01	0,68	0,17	1,42	5,37	6,94	5,26	0,59
	высокий high	1,82	9,56	9,25	5,32	1,21	3,97	16,44	18,35	13,70	1,94
	очень высокий very high	2,56	13,54	12,89	7,38	1,67	5,10	21,33	23,39	17,42	2,54

Окончание табл. 1 | End of the Table 1

Показатель Parameter		2016–2017 – 2022–2023					2021–2022 – 2023–2024				
		всего total	возраст, лет age, years				всего total	возраст, лет age, years			
			0–2	3–6	7–14	15+		0–2	3–6	7–14	15+
Южный ФО Southern Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,06	0,12	0,16	0,15	0,07	0,07	0,11	0,11	0,26	0,06
	постэпидемические post-epidemic	0,06	0,25	0,17	0,08	0,06	0,06	0,34	0,14	0,16	0,06
средний medium		0,47	1,89	1,74	0,73	0,27	0,57	3,43	2,20	0,81	0,28
ПИ IT	высокий high	1,02	5,15	3,73	1,56	0,68	2,20	7,70	6,07	4,43	1,53
	очень высокий very high	1,27	6,60	4,61	1,93	0,86	2,92	9,59	7,78	6,04	2,08
Северо-Западный ФО Northwest Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,03	0,16	0,17	0,07	0,02	0,03	0,16	0,15	0,03	0,02
	постэпидемические post-epidemic	0,05	0,26	0,26	0,20	0,04	0,07	0,31	0,31	0,24	0,04
средний medium		0,36	1,31	1,38	0,93	0,21	0,54	3,56	2,90	2,24	2,42
ПИ IT	высокий high	1,16	5,06	4,02	2,49	0,77	6,31	10,40	10,96	9,86	8,31
	очень высокий very high	1,51	6,72	5,18	3,17	1,02	8,85	13,43	14,53	13,22	10,91
Дальневосточный ФО Far Eastern Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,17	0,31	0,30	0,30	0,10	0,16	0,34	0,16	0,21	0,12
	постэпидемические post-epidemic	0,11	0,66	0,60	0,24	0,08	0,11	0,83	0,70	0,30	0,10
средний medium		0,91	3,07	2,69	1,45	0,58	1,56	6,27	5,33	3,74	0,80
ПИ IT	высокий high	2,04	8,45	6,62	4,15	1,27	3,63	14,15	11,68	7,71	2,27
	очень высокий very high	2,54	10,83	8,36	5,34	1,58	4,54	17,64	14,49	9,47	2,91
Сибирский ФО Siberian Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,02	0,09	0,09	0,03	0,01	0,02	0,09	0,08	0,03	0,01
	постэпидемические post-epidemic	0,04	0,17	0,14	0,08	0,02	0,05	0,13	0,14	0,08	0,03
средний medium		0,40	1,77	1,49	0,80	0,21	0,53	3,14	2,03	1,53	0,20
ПИ IT	высокий high	0,75	4,43	2,95	1,91	0,41	1,24	6,83	3,81	2,85	0,75
	очень высокий very high	0,90	5,60	3,59	2,40	0,50	1,55	8,47	4,60	3,43	0,99
Северо-Кавказский ФО North Caucasian Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,03	0,14	0,29	0,22	0,03	0,19	0,27	0,29	0,20	0,53
	постэпидемические post-epidemic	0,04	0,14	0,39	0,11	0,04	0,06	0,49	0,23	0,27	0,04
средний medium		0,17	2,83	2,38	0,77	0,13	0,41	6,24	4,68	3,28	1,02
ПИ IT	высокий high	2,23	7,55	7,70	6,27	1,68	3,33	10,66	10,84	10,40	3,30
	очень высокий very high	3,15	9,63	10,04	8,69	2,37	4,63	12,61	13,56	13,55	4,30
Уральский ФО Ural Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,03	0,07	0,06	0,03	0,03	0,03	0,12	0,08	0,05	0,02
	постэпидемические post-epidemic	0,04	0,09	0,10	0,04	0,04	0,04	0,09	0,06	0,02	0,05
средний medium		0,23	0,24	0,33	0,28	0,24	0,26	1,02	0,65	0,51	0,35
ПИ IT	высокий high	0,59	1,26	1,10	0,71	0,60	1,23	3,13	2,70	1,74	1,17
	очень высокий very high	0,76	1,71	1,44	0,90	0,76	1,65	4,07	3,61	2,27	1,54
Приволжский ФО Volga Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,02	0,12	0,10	0,03	0,02	0,01	0,14	0,08	0,02	0,01
	постэпидемические post-epidemic	0,05	0,30	0,18	0,09	0,04	0,06	0,32	0,16	0,07	0,04
средний medium		0,37	1,40	1,32	0,56	0,23	0,74	2,57	2,57	2,06	0,42
ПИ IT	высокий high	0,95	3,53	2,76	2,08	0,67	2,68	10,73	7,75	5,24	1,87
	очень высокий very high	1,21	4,48	3,40	2,75	0,86	3,54	14,34	10,03	6,65	2,51

Таблица 2. БЛ и ПИ госпитализации с «гриппом» на 10 тыс. населения
Table 2. Baselines and thresholds for rates of hospitalization with “influenza”, per 10,000

Показатель Parameter		2016–2017 – 2022–2023					2021–2022 – 2023–2024				
		всего total	возраст, лет age, years				всего total	возраст, лет age, years			
			0–2	3–6	7–14	15+		0–2	3–6	7–14	15+
Россия Russia											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,03	0,15	0,09	0,05	0,03	0,01	0,11	0,04	0,02	0,01
	постэпидемические post-epidemic	0,03	0,14	0,11	0,06	0,03	0,02	0,25	0,07	0,03	0,01
	средний medium	0,24	1,13	0,91	0,42	0,14	0,27	1,92	1,18	0,55	0,13
ПИ IT	высокий high	0,49	3,04	1,86	0,80	0,29	0,62	4,24	2,35	1,01	0,35
	очень высокий very high	0,60	3,89	2,28	0,97	0,35	0,77	5,26	2,87	1,22	0,45
Центральный ФО Central Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,04	0,19	0,19	0,08	0,02	0,01	0,13	0,07	0,03	0,01
	постэпидемические post-epidemic	0,02	0,09	0,07	0,03	0,01	0,02	0,10	0,08	0,05	0,01
	средний medium	0,15	0,78	0,81	0,40	0,10	0,30	2,12	1,69	0,74	0,11
ПИ IT	высокий high	0,45	3,82	2,67	1,03	0,23	0,69	5,59	3,79	1,41	0,30
	очень высокий very high	0,58	5,16	3,49	1,31	0,29	0,86	7,12	4,71	1,71	0,39
Южный ФО Southern Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,06	0,11	0,15	0,14	0,06	0,06	0,10	0,11	0,08	0,03
	постэпидемические post-epidemic	0,05	0,21	0,72	0,07	0,04	0,05	0,25	0,11	0,13	0,05
	средний medium	0,45	1,93	1,71	0,68	0,24	0,47	3,32	1,95	0,83	0,20
ПИ IT	высокий high	0,96	5,09	3,69	1,52	0,60	1,00	6,22	3,01	1,52	0,65
	очень высокий very high	1,18	6,49	4,57	1,89	0,76	1,24	7,51	3,47	1,82	0,84
Северо-Западный ФО Northwest Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,02	0,20	0,15	0,06	0,01	0,03	0,23	0,16	0,07	0,02
	постэпидемические post-epidemic	0,03	0,19	0,18	0,17	0,03	0,04	0,17	0,16	0,09	0,02
	средний medium	0,24	1,21	0,94	0,56	0,13	0,33	1,91	1,21	0,78	0,37
ПИ IT	высокий high	0,71	3,82	2,32	1,29	0,46	0,92	5,08	2,93	1,67	0,77
	очень высокий very high	0,91	4,97	2,93	1,62	0,60	1,18	6,48	3,70	2,06	0,94
Дальневосточный ФО Far Eastern Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,13	0,23	0,23	0,24	0,09	0,00	0,08	0,14	0,12	0,07
	постэпидемические post-epidemic	0,08	0,41	0,36	0,12	0,06	0,07	0,74	0,19	0,22	0,08
	средний medium	0,62	2,40	1,62	0,87	0,42	0,62	3,50	1,70	0,92	0,38
ПИ IT	высокий high	1,28	6,20	3,70	1,80	0,86	1,43	7,75	4,10	2,02	0,95
	очень высокий very high	1,57	7,88	4,61	2,21	1,05	1,79	9,63	5,15	2,51	1,20
Сибирский ФО Siberian Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,02	0,08	0,07	0,03	0,01	0,01	0,13	0,03	0,03	0,00
	постэпидемические post-epidemic	0,02	0,14	0,11	0,06	0,01	0,02	0,08	0,07	0,03	0,01
	средний medium	0,21	1,33	0,81	0,36	0,09	0,22	2,26	0,79	0,38	0,07
ПИ IT	высокий high	0,43	3,31	1,65	0,73	0,22	0,46	4,50	1,68	0,58	0,23
	очень высокий very high	0,53	4,19	2,03	0,89	0,28	0,57	5,48	2,08	0,66	0,30
Северо-Кавказский ФО North Caucasian Federal District											
БЛ BL	предэпидемические pre-epidemic	0,01	0,00	0,18	0,17	0,02	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00
	постэпидемические post-epidemic	0,02	0,14	0,25	0,06	0,03	0,01	0,35	0,00	0,00	0,00
	средний medium	0,15	2,00	1,42	0,74	0,10	0,08	3,29	1,48	1,44	0,15
ПИ IT	высокий high	0,67	4,46	3,39	1,67	0,45	0,70	5,12	3,93	2,18	0,56
	очень высокий very high	0,91	5,54	4,26	2,08	0,60	0,98	5,94	5,01	2,51	0,75

Окончание табл. 2 | End of the Table 2

Показатель Parameter		2016–2017 – 2022–2023					2021–2022 – 2023–2024				
		всего total	возраст, лет age, years				всего total	возраст, лет age, years			
			0–2	3–6	7–14	15+		0–2	3–6	7–14	15+
Уральский ФО Ural Federal District											
БЛ	предэпидемические pre-epidemic	0,01	0,06	0,05	0,02	0,02	0,00	0,05	0,04	0,02	0,00
ВЛ	постэпидемические post-epidemic	0,02	0,08	0,03	0,00	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,01
	средний medium	0,11	0,21	0,16	0,06	0,14	0,07	0,49	0,29	0,04	0,09
ПИ	высокий high	0,27	0,82	0,46	0,22	0,30	0,26	3,32	0,91	0,45	0,20
ИТ	очень высокий very high	0,34	1,09	0,59	0,29	0,37	0,34	4,57	1,18	0,62	0,25
Приволжский ФО Volga Federal District											
БЛ	предэпидемические pre-epidemic	0,02	0,12	0,10	0,03	0,02	0,01	0,08	0,06	0,01	0,01
ВЛ	постэпидемические post-epidemic	0,03	0,23	0,14	0,08	0,02	0,02	0,15	0,04	0,02	0,01
	средний medium	0,24	1,05	0,76	0,32	0,16	0,22	1,38	0,70	0,31	0,15
ПИ	высокий high	0,44	2,50	1,58	0,67	0,28	0,57	4,26	1,89	0,86	0,35
ИТ	очень высокий very high	0,53	3,15	1,94	0,83	0,34	0,72	5,53	2,41	1,11	0,45

пике эпидемии превышала очень высокий порог интенсивности во всех возрастных группах, кроме детей 0–2 лет, у которых она была «высокого» уровня. Начиная с 52-й недели заболеваемость стала снижаться во всех возрастных группах, но оста-

валась выше постэпидемической БЛ у детей 0–2 и 3–6 лет — до 15-й недели (включительно), среди детей 7–14 лет и лиц 15+ лет — до 18-й недели.

За период эпидемии 2023–2024 гг. заболели гриппом 0,27% всего населения наблюдаемых горо-

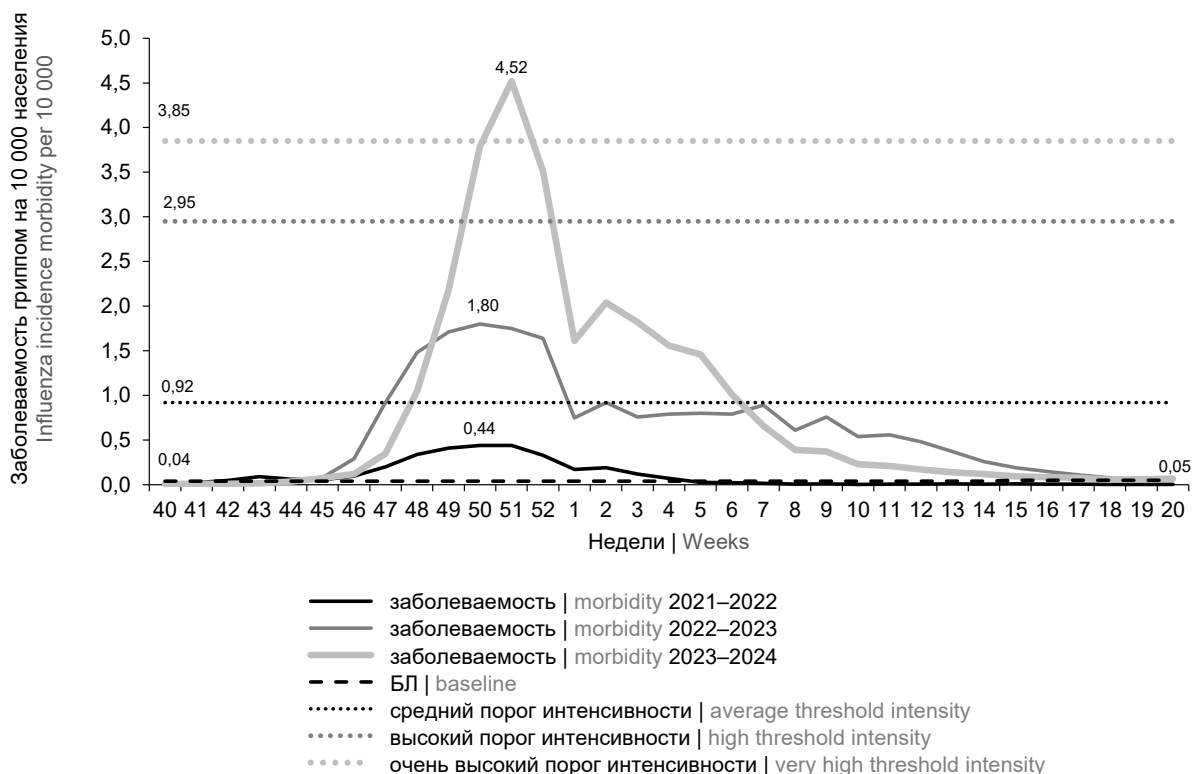


Рис. 1. Динамика заболеваемости гриппом населения наблюдаемых городов (61) в сезон 2021–2022, 2022–2023 и 2023–2024 гг.

Fig. 1. Dynamics of influenza incidence in the population of the surveyed cities (61) in the seasons 2021–2022, 2022–2023, and 2023–2024.

дов (150 439 человек), в том числе 0,88% детей в возрасте 0–2 лет, 0,8% — 3–6 лет, 0,57% — 7–14 лет и 0,19% лиц в возрасте 15 лет и старше. За период эпидемии 2022–2023 гг. переболело гриппом 0,19% всего населения наблюдаемых городов (105 881 человек), в том числе 0,81% детей в возрасте 0–2 лет, 0,66% — 3–6 лет, 0,46% — 7–14 лет и 0,12% лиц в возрасте 15 лет и старше (рис. 2).

Географическое распространение эпидемии, её интенсивность в разных ФО

Эпидемия началась прежде всего (на 43-й неделе) в городах Уральского ФО; на 44-й неделе она была зарегистрирована в других 3 ФО (Северо-Западном, Приволжском и Центральном), на 46-й неделе — в Сибирском ФО, на 47-й — в Дальневосточном ФО, на 49-й — в Южном ФО и последним в эпидемию был вовлечён Северо-Кавказский ФО (на 51-й неделе).

Пик заболеваемости был достигнут ранее всего (на 50-й неделе) в Дальневосточном ФО (4,6 на 10 000 населения), на 51-й неделе — в Северо-Западном (11,56), Центральном (5,41) и Уральском ФО (1,91), на 52-й неделе — в Сибирском ФО (1,59), на 2-й неделе — в Приволжском ФО (3,57), на 5-й неделе — в Северо-Кавказском (4,94) и Южном ФО (3,86). Эпидемия гриппа закончилась раньше всего (на 13-й неделе) — в Сибирском и Дальневосточном ФО, на 14-й неделе — в Приволжском и

Северо-Кавказском ФО, на 17-й неделе — в Южном ФО, на 19-й неделе — в Центральном ФО, однако в Северо-Западном и Уральском ФО на 19-й неделе заболеваемость гриппом оставалась выше их постэпидемических БЛ. Таким образом, продолжительность эпидемии в округах варьировала от 16 нед в Северо-Кавказском ФО до 29 нед в Уральском ФО.

Интенсивность заболеваемости на пике эпидемии

Интенсивность заболеваемости гриппом на пике эпидемии была очень высокой, намного превышая порог этого уровня, в Северо-Западном ФО (11,6 против 8,85 на 10 000 населения) и Южном ФО (3,9 против 2,92 на 10 000), в остальных ФО она также достигла очень высокого уровня, но незначительно превышала этот ПИ (рис. 3).

Госпитализация

Рост частоты госпитализации больных гриппом привел к превышению БЛ на 45-й неделе, одновременно с началом подъёма заболеваемости. Госпитализация достигла пика (0,55 на 10 000 населения) на 51-й неделе, когда её уровень превысил порог «средней» интенсивности. В дальнейшем частота госпитализации снижалась и с 6-й недели была низкого уровня интенсивности, а с 15-й недели — ниже БЛ (рис. 4). Снижение госпитализации с марта по май, по-видимому, объясняется преиму-

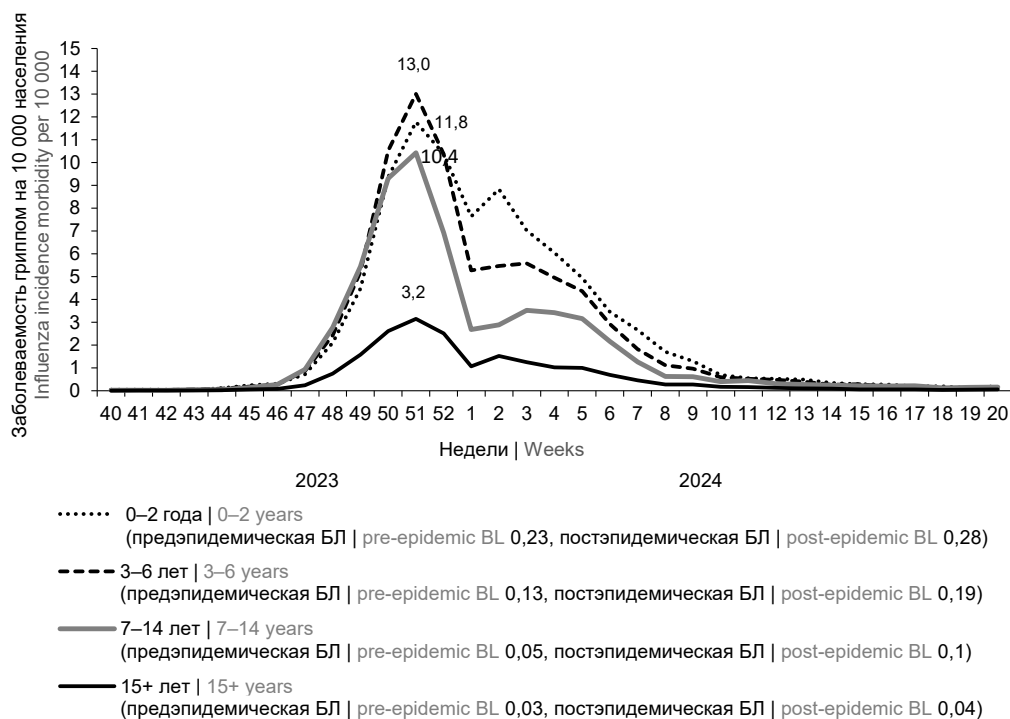


Рис. 2. Динамика заболеваемости гриппом в разных возрастных группах населения наблюдаемых городов (61) в сезон 2023–2024 гг.

Fig. 2. Dynamics of influenza incidence in different age groups of the population of the surveyed cities (61) in the 2023–2024 season.

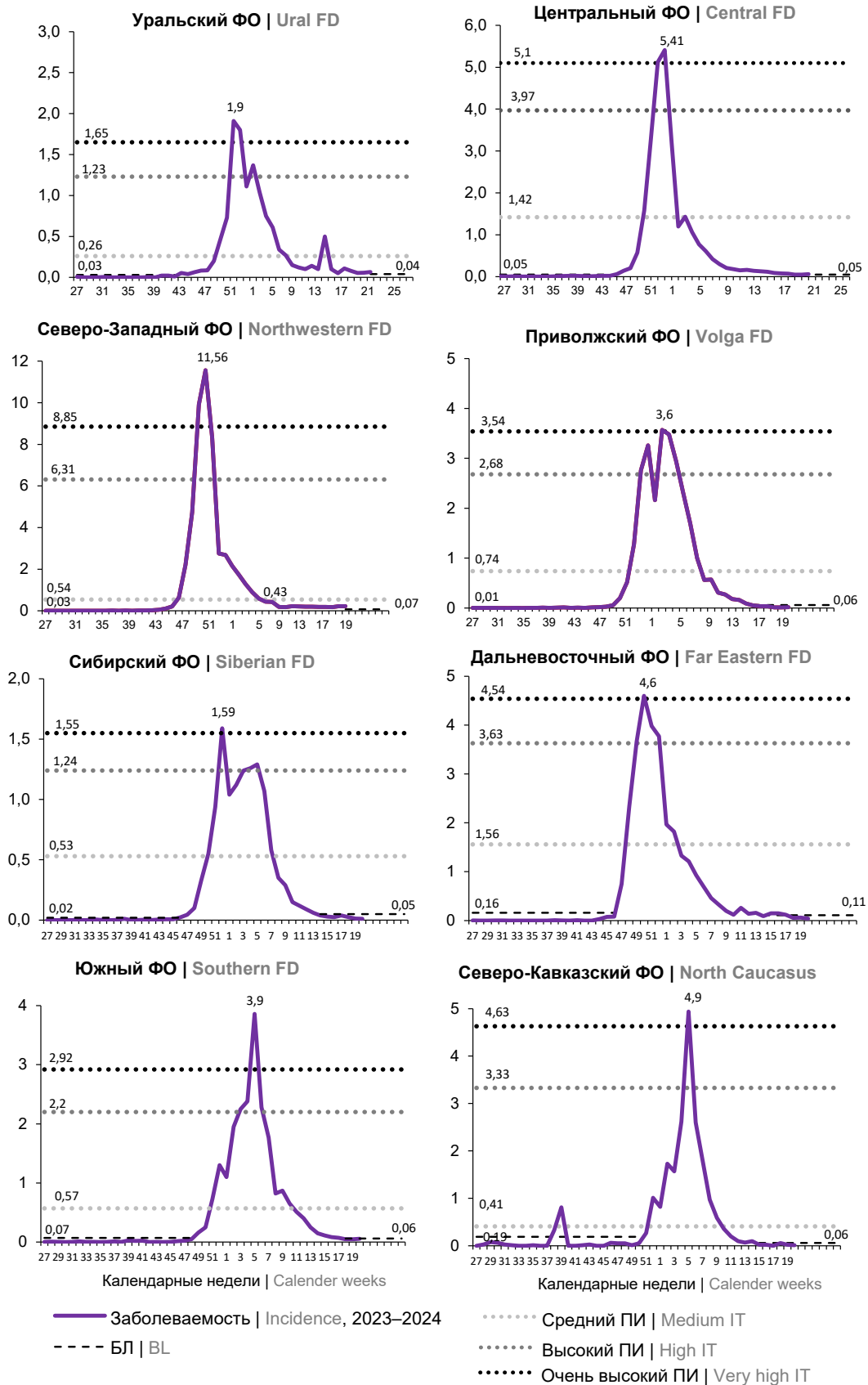


Рис. 3. Сравнение динамики и уровня интенсивности заболеваемости гриппом (на 10 000 населения) в разных ФО в сезон 2023–2024 гг.

Fig. 3. Comparison of the dynamics and intensity level of influenza incidence in different Federal Districts (FD) in the 2023–2024 season.

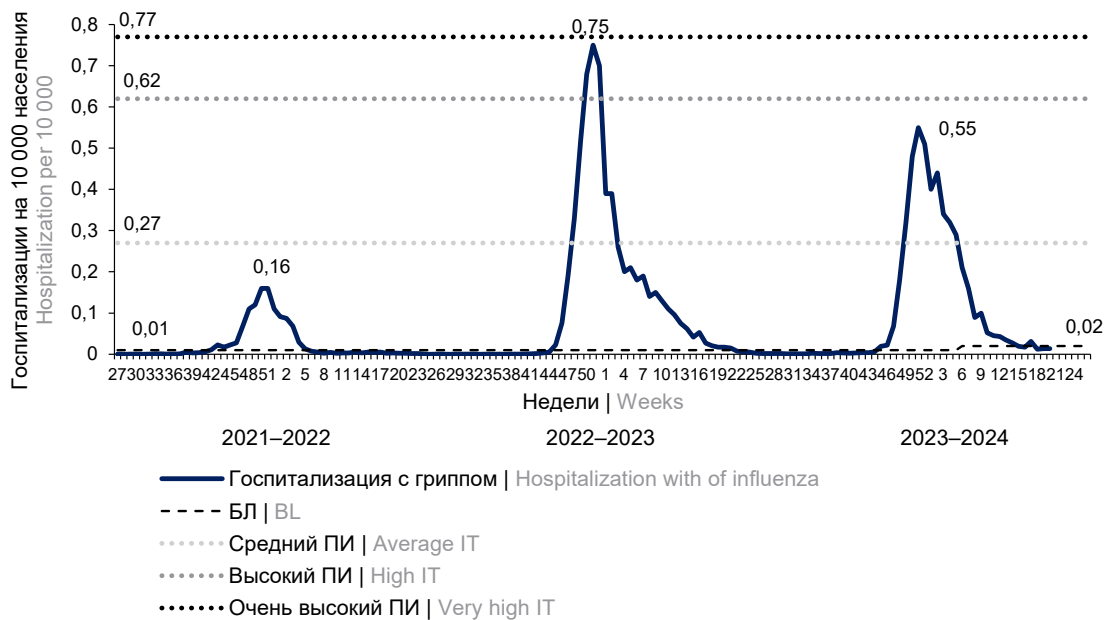


Рис. 4. Динамика частоты госпитализации пациентов с диагнозом «грипп» в сезоны 2021–2022, 2022–2023 и 2023–2024 гг.

Fig. 4. Dynamics of the frequency of hospitalization of patients diagnosed with influenza in seasons 2021–2022, 2022–2023, and 2023–2024.

щественной циркуляцией в это время вируса гриппа В и более лёгким течением заболевания, чем при гриппе А(Н3N2).

За период эпидемии было госпитализировано 0,05% всего населения, из них 0,32% детей в возрасте 0–2 лет, 0,16% — 3–6 лет, 0,07% — 7–14 лет и 0,02% лиц в возрасте 15–64 года и 0,05% лиц старше 65 лет. Доля лиц, госпитализированных за период эпидемии, от числа заболевших гриппом составила в среднем около 17,3%, в том числе среди детей

0–2 лет — 35,9%, 3–6 лет — 19,6% лет, 7–14 лет — 12,6%, среди лиц в возрасте 15–64 года — 12,7% и лиц в возрасте старше 65 лет — 26,7%.

Летальность от гриппа

В сезон 2023–2024 гг. получены сообщения о 41 летальном исходе от лабораторно подтверждённого гриппа: 39 случаев от гриппа А(Н3N2) и 2 случая от гриппа А(Н3N2)+COVID-19. В этом сезоне летальные исходы регистрировали с 48-й недели

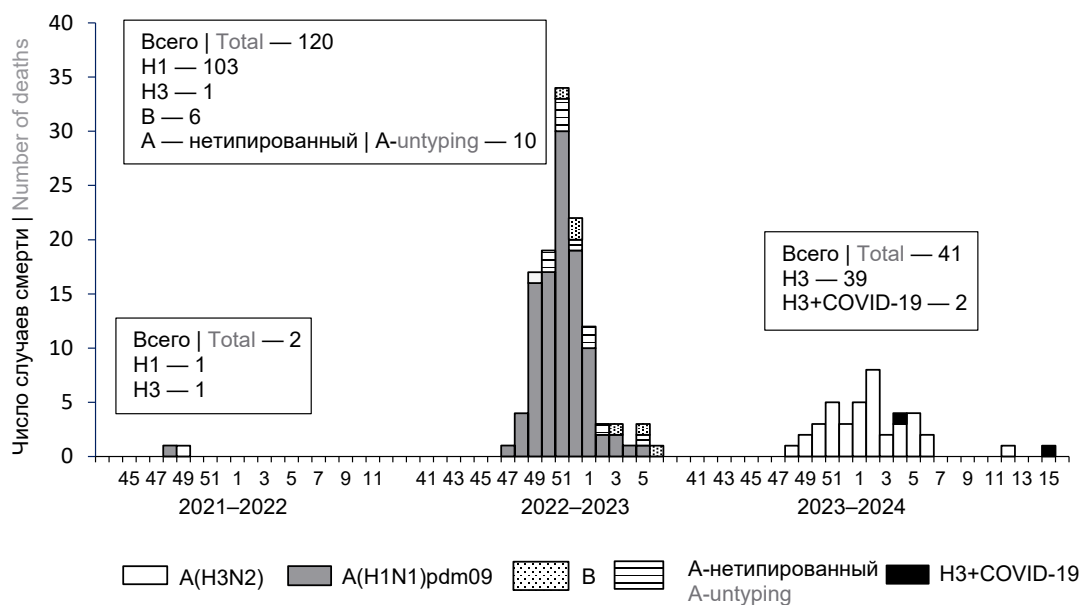


Рис. 5. Число и этиология летальных исходов от лабораторно подтверждённого гриппа в эпидемии с 2021 по 2024 г.

Fig. 5. The number and etiology of deaths from laboratory-confirmed influenza in the epidemic from 2021 to 2024.

2023 г. по 15-ю неделю 2024 г. (с ноября по апрель) и только от гриппа А(Н3N2), т. е. в период его циркуляции. Случаи смерти от смешанной инфекции А(Н3N2) и COVID-19 зарегистрированы в январе и апреле. Случаев смерти от гриппа В зарегистрировано не было, несмотря на преимущественную его циркуляцию с марта по май.

Во время предыдущей эпидемии в сезон 2022–2023 гг., где основным возбудителем был вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, лабораторно подтверждено 120 летальных исходов от гриппа: 103 случая — от гриппа А(Н1N1)pdm09, 6 случаев — от гриппа В, 1 случай — от гриппа А(Н3N2), 10 случаев — от гриппа А (не субтипированных).

Следует отметить, что в эпидемию 2021–2022 гг., где возбудителем был только вирус гриппа А(Н3N2), зарегистрированы только 2 случая смерти от лабораторно подтверждённого гриппа (рис. 5).

В возрастной структуре умерших в последнем сезоне преобладали пожилые люди в возрасте 65+ лет (56,1%; $p < 0,05$). Доля умерших в возрасте 42–64 года составила 24,3%, доля детей до 6-летнего возраста — 4,8%, 7–14 лет — 4,8% от общего числа умерших (рис. 6). Среди умерших больные с сердечно-сосудистой патологией составляли 66,0% ($p < 0,05$), с болезнями внутренних органов — 44,0% ($p < 0,05$), что связано с увеличением лиц пожилого возраста в последнюю эпидемию. Другими факторами риска летальных исходов были такие сопутствующие заболевания, как хронические болезни лёгких (17,1%) и состояния с иммунодефицитами (17,1%).

Сравнение динамики заболеваемости гриппом, ОРВИ и COVID-19 показало чередование возбудителей гриппа и COVID-19 (рис. 7). В сезон 2021–2022 гг. волна геноварианта Delta предшествовала

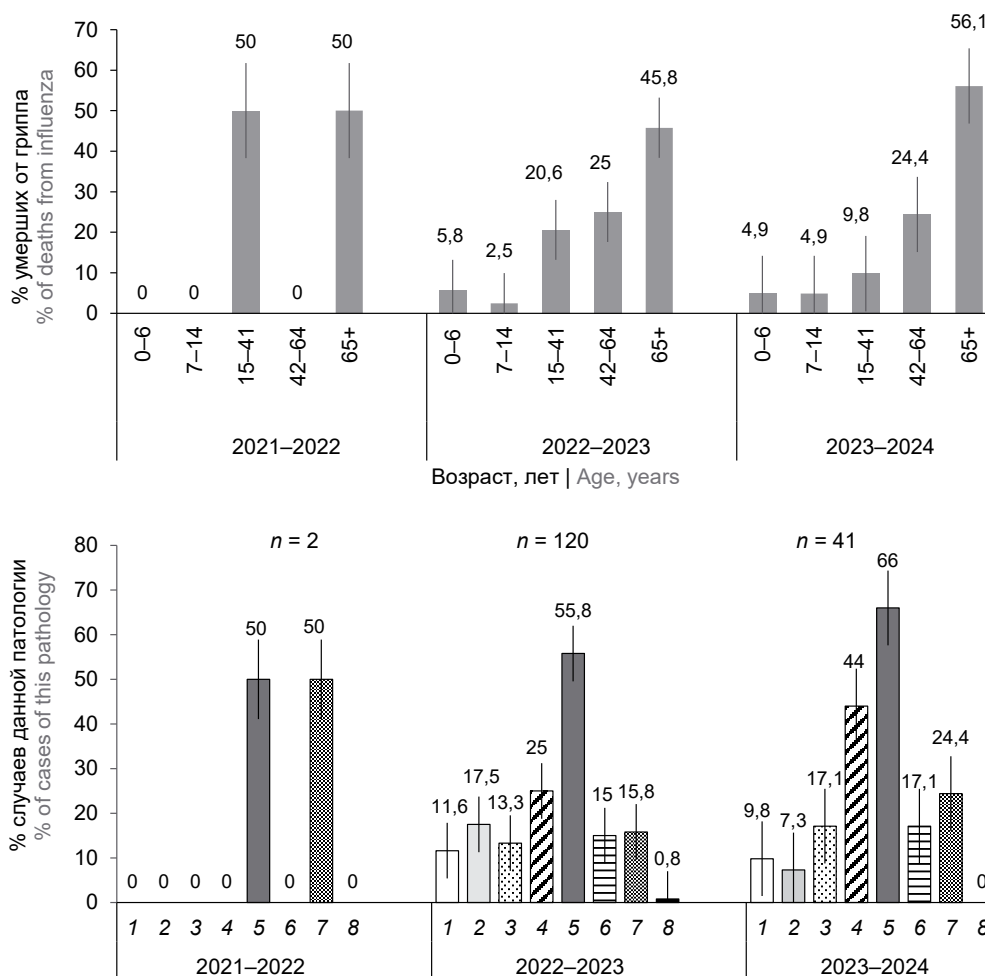


Рис. 6. Возрастная структура и структура фоновой патологии умерших от лабораторно подтверждённого гриппа в эпидемии с 2021 по 2024 г.

1 — ожирение; 2 — диабет; 3 — иммунодефициты; 4 — болезни внутренних органов; 5 — сердечно-сосудистая патология; 6 — хронические болезни лёгких; 7 — болезни центральной нервной системы; 8 — беременность.

Fig. 6. Age structure and structure of background pathology of those who died from laboratory confirmed influenza during the epidemic in 2021–2024.

1 — obesity; 2 — diabetes; 3 — immunodeficiencies; 4 — diseases of internal organs; 5 — cardiovascular pathology; 6 — chronic lung diseases; 7 — diseases of the central nervous system; 8 — pregnancy.

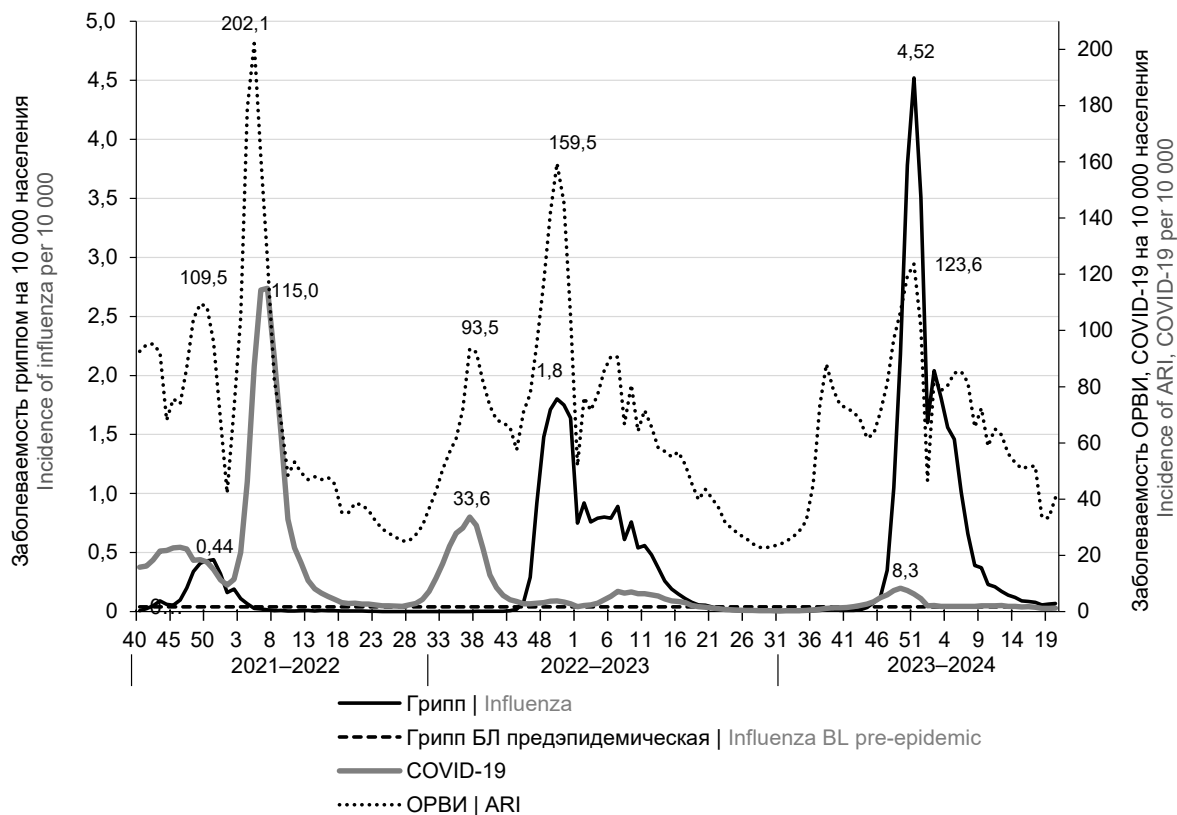


Рис. 7. Сравнение динамики заболеваемости гриппом, ОРВИ и COVID-19 в наблюдаемых городах в сезоны с 2021 по 2024 г.

Fig. 7. Comparison of the incidence dynamics of influenza, ARVI and COVID-19 in the surveyed cities during the seasons from 2021 to 2024.

эпидемии гриппа А(Н3N2) низкой интенсивности, которую в свою очередь сменила эпидемия геноварианта Omicron высокой интенсивности. В сезон 2022–2023 гг. эпидемия, вызванная дочерними геновариантами Omicron, сменилась эпидемией гриппа А(Н1N1)рdm09 и В, которая была средней интенсивности по заболеваемости. И только в сезон 2023–2024 гг. волна COVID-19 и эпидемия А(Н3N2) и В начались одновременно, при этом волна COVID-19 была низкой интенсивности, а эпидемия гриппа А(Н3N2) и В — очень высокой.

Другие исследователи приводят данные, свидетельствующие о возможной интерференции возбудителей SARS-COV-2, гриппа и других ОРВИ друг с другом по данным как сигнального, так и традиционного надзора [4–6].

Особенностью эпидемии гриппа 2023–2024 гг. явилось раннее начало (на 45-й неделе 2023 г.), как и в другие эпидемии гриппа на фоне циркуляции COVID-19 (в 2021 г. — на 45-й неделе, в 2022 г. — на 47-й неделе). Раннее начало эпидемий гриппа в период циркуляции COVID-19 также отмечали в Белоруссии, эпидемический по гриппу сезон 2021–2022 гг. начался с 47-й недели, в 2023–2024 гг. — с 47-й недели, а в Ташкенте эпидемический по гриппу сезон 2023–2024 гг. начался с 44-й недели [7–9].

Такое раннее начало эпидемий гриппа наблюдали только в истории пандемий гриппа: на 39-й календарной неделе 1957 г. началась пандемия гриппа А/Сингапур/57(Н2N2), в ноябре 1977 г. — пандемия А/СССР/90/77(Н1N1), на 39-й календарной неделе 2009 г. — пандемия А/Калифорния/09(Н1N1) [10–14].

Можно предположить, что раннее начало пандемий гриппа могло быть обусловлено антигенной новизной пандемического вируса гриппа, А/Сингапур/57(Н2N2), А/Калифорния/09(Н1N1), к которому у большинства населения не было иммунитета, а в период пандемии COVID-19 — снижением иммунитета к гриппу у населения, ранее переболевшего COVID-19.

Заключение

Сравнение БЛ, рассчитанных за 6 сезонов до пандемии COVID-19, и новых БЛ и ПИ эпидемий по заболеваемости и госпитализации с диагнозом «грипп», подтверждённым методом ПЦР, рассчитанных за 3 эпидемии на фоне пандемии COVID-19, показало незначительные изменения в показателях БЛ, а ПИ увеличились.

На фоне пандемии COVID-19 в первый сезон (2020–2021 гг.) эпидемии гриппа не было. В сезон

2021–2022 гг. эпидемия моноэтиологии А(Н3N2) была низкой интенсивности по заболеваемости и частоте госпитализации, а также с низкой летальностью (2 случая). В сезон 2022–2023 гг. эпидемия гриппа А(Н1N1)pdm09 и В была средней интенсивности по заболеваемости, с высоким уровнем частоты госпитализаций и высокой летальностью (120 случаев). Эпидемия гриппа А(Н3N2) и В в сезон 2023–2024 гг. по интенсивности заболеваемости гриппом была «очень высокого» уровня, но средней по частоте госпитализаций и летальности (41 случай). Заболеваемость последней, по сравнению с предыдущей эпидемией, была больше (0,28 и 0,19% всего населения), в том числе лиц старше 15 лет (0,19 и 0,12%). Таким образом, вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 по-прежнему остаётся основной причиной летальных исходов.

Одной из причин высокой заболеваемости гриппом в последнюю эпидемию может быть увеличение регистрации заболеваемости гриппом при увеличении тестирования на грипп методом ПЦР. Нельзя исключить влияние интерференции между гриппом и COVID-19, снижение заболеваемости COVID-19 и увеличение заболеваемости гриппом в последнем сезоне.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Карпова Л.С., Столяров К.А., Пелих М.Ю. Совершенствование традиционной системы надзора в национальном центре по гриппу в условиях пандемии COVID-19 (2020–2023). *Журнал инфектологии*. 2024;16(2S1):245–6. Karpova L.S., Stolyarov K.A., Pelikh M.Yu. Improving the traditional surveillance system at the national influenza center during the COVID-19 pandemic (2020-23). *Journal Infectology*. 2024;16(2S1):245–6.
- 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>
- 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>
- Аношко О.Н., Лапо Т.П., Кищенко Е.Н., et al. Вклад вирусов гриппа, SARS-CoV-2 и других респираторных патогенов в этиологическую структуру возбудителей тяжелых острых респираторных инфекций в Республике Беларусь в 2021–2022 гг. В кн.: *Сборник научных трудов «БГМУ – в авангарде медицинской науки и практики»*. Выпуск 12. Минск;2022:294–9. Anoshko O.N., Lapo T.P., Kishchenko E.N., et al. Contribution of influenza viruses, SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens to the etiological structure of severe acute respiratory infection causes in the Republic of Belarus in 2021–2022. In: *Collection of Scientific Papers «BSMU – at the Forefront of Medical Science and Practice»*. Issue 12. Minsk;2022:294–9.
- Сомнина 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>
- Горенчук А.Н., Жоголев С.Д., Жоголев К.Д. и др. Изменение этиологии острых болезней органов дыхания в организованных коллективах в период пандемии COVID-19 по сравнению с доковидным периодом. В кн.: *Микробиология военной медицины и здравоохранению. Современные технологии: наука, практика, инновации: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня основания кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова*. СПб.;2023:28–34. Gorenchuk A.N., Zhogolev S.D., Zhogolev K.D., et al. Changes in the etiology of acute respiratory diseases in organized groups during the COVID-19 pandemic compared to the pre-COVID period. In: *Microbiology to Military Medicine and Healthcare. Modern Technologies: Science, Practice, Innovation: Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference Dedicated to the 100th Anniversary of the Founding of the Department of Microbiology of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov*. St. Petersburg;2023:28–34.
- Аношко О.Н., Лапо Т.П., Кищенко Е.Н. и др. Эпидемический процесс по гриппу во время пандемии COVID-19 в Республике Беларусь. В кн.: *Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых*. СПб.;2023:10–1. Anoshko O.N., Lapo T.P., Kishchenko E.N., et al. Epidemic process of influenza during the COVID-19 pandemic in the Republic of Belarus. In: *Viral Infections – from Diagnosis to Clinic: Collection of Abstracts of the Russian Conference of Young Scientists*. St. Petersburg;2023:10–1.
- Дорош А.В., Смородинцева Е.А., Столяров К.А. Этиология ТОРИ в период пандемии COVID-19 по данным сигнального надзора. В кн.: *Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых*. СПб.;2024:16–7. Dorosh A.V., Smorodintseva E.A., Stolyarov K.A. Etiology of SARI during the COVID-19 pandemic according to sentinel surveillance data. In: *Viral Infections – from Diagnosis to Clinic: Collection of Abstracts of the Russian Conference of Young Scientists*. St. Petersburg;2024:16–7.
- Переяслов Д.И., Ибадуллаева Н.С., Рахимов Р.А. и др. Эпидемическая обстановка по гриппу и ОРВИ в сезон 2023–2024 гг. *Журнал инфектологии*. 2024;16(2S1):275. Pereyaslov D.I., Ibadullayeva N.S., Rakhimov R.A., et al. The epidemic situation of influenza and ARI in the 2023–2024 season. *Journal Infectology*. 2024;16(2S1):275.
- Аншелес И.М., Фридман Э.А., Стенина Е.С. и др. Некоторые итоги эпидемиологических, иммунологических и вирусологических сопоставлений по материалам эпидемических волн гриппа типа А2 1957 и 1959 гг. в Ленинграде. В кн.: *Этиология, иммунология и клиника азиатского гриппа: Труды института экспериментальной медицины АМН СССР*. Л.;1961:138–47. Ansheles I.M., Fridman E.A., Stenina E.S., et al. Some results of epidemiological, immunological and virological comparisons based on materials from the epidemic waves of influenza type A2 in 1957 and 1959 in Leningrad. In: *Etiology, Immunology and Clinic of Asian Influenza: Proceedings of the Institute of Experimental Medicine of the USSR Academy of Medical Sciences*. Leningrad;1961:138–47.
- Смородинцев А.А. Итоги изучения этиологии и иммунологии азиатского гриппа типа А2 в Ленинграде. В кн.: *Этиология, иммунология и клиника азиатского гриппа: Труды института экспериментальной медицины АМН СССР*. Л.;1961:127–37. Smorodintsev A.A. Results of the

- study of the etiology and immunology of Asian influenza type A2 in Leningrad. In: *Etiology, Immunology and Clinic of Asian Influenza: Proceedings of the Institute of Experimental Medicine of the USSR Academy of Medical Sciences*. Leningrad;1961:127–37.
12. Карпухин Г.И. Особенности распространения гриппа А1 в мире и СССР. В кн.: *Проблемы гриппа и острых респираторных заболеваний: Сборник научных трудов ВНИИ гриппа. Том 2*. Л.;1979:5–17. Karpukhin G.I. Features of the spread of influenza A1 in the world and the USSR. In: *Problems of Influenza and Acute Respiratory Diseases: Collection of Scientific Works of Russian Research Institute of Influenza. Volume 2*. Leningrad;1979:5–17.
13. Карпова Л.С., Маринич И.Г., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Эпидемиология гриппа А(Н1N1) Калифорния/07/09 среди населения 49 городов России в сезон 2009–2010 гг.

Информация об авторах

Карпова Людмила Серафимовна[✉] — д. м. н., зав. лаб. эпидемиологии гриппа и ОРЗ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, epidlab@influenza.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6621-5977>

Пелих Мария Юрьевна — н. с. лаб. эпидемиологии гриппа и ОРЗ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-1996-4512>

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>

Волик Ксения Михайловна — ведущий программист лаб. эпидемиологии гриппа и ОРЗ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5557-9318>

Столярова Татьяна Петровна — техник лаб. эпидемиологии гриппа и ОРЗ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0004-2882-0016>

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

Участие авторов: Карпова Л.С. — концепция и дизайн исследования, написание текста; Пелих М.Ю. — сбор и обработка данных; Столяров К.А. — создание компьютерной базы данных; Волик К.М. — статистическая обработка данных; Столярова Т.П. — сбор данных, оформление статьи в части визуализации и отображении данных; Даниленко Д.М. — утверждение окончательного варианта. 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 26.04.2024;
принята к публикации 16.07.2024;
опубликована 30.10.2024

Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;88(3):14–20. Karpova L.S., Marinich I.G., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P. Epidemiology of influenza A/CALIFORNIA/07/09 (H1N1) in population of 49 cities in Russia in 2009–2010. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;88(3):14–20.
EDN: <https://elibrary.ru/rsypel>

14. Карпова Л.С., Бурцева Е.И., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Сравнение эпидемий гриппа в России 2009 и 2011 годов, вызванных пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012;60(5):6–15. Karpova L.S., Burtseva E.I., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P. Comparison of influenza epidemics in Russia 2009 and 2011, caused by pandemic influenza A(H1N1). *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2012;60(5):6–15.
EDN: <https://elibrary.ru/oiicn>

Information about the authors

Ludmila S. Karpova[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of epidemiology of influenza and ARI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, epidlab@influenza.spb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6621-5977>

Maria Yu. Pelikh — researcher, Laboratory of epidemiology of influenza and ARI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-1996-4512>

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

Ksenia M. Volik — leading programmer, Laboratory of epidemiology of influenza and ARI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5557-9318>

Tatyana P. Stolyarova — technician, Laboratory of epidemiology of influenza and ARI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0004-2882-0016>

Daria M. Danilenko — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Deputy director for science, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6174-0836>

Authors contribution: Karpova L.S. — concept and design of the study, writing the text; Stolyarov K.A. — creation of a computer database; Pelikh M.Yu. — data collection and processing; Volik K.M. — statistical data processing; Stolyarova T.P. — data collection, design of the article in terms of visualization and display of data; Danilenko D.M. — approval of the final version. 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 26.04.2024;
accepted for publication 16.07.2024;
published 30.10.2024

НАУКА И ПРАКТИКА

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-574>



Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени для выявления генов *qacA/B* и *smr* у грамположительных бактерий

Ковальчук С.Н.✉, Архипова А.Л., Ковылкова С.Ю., Ильина Е.Н., Федорова Л.С.

Институт системной биологии и медицины, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Дезинфицирующие вещества (ДВ) являются эффективными средствами неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Нарушение режимов применения ДВ приводит к формированию устойчивости микроорганизмов к ним. Для целей мониторинга распространения клинически значимых микроорганизмов, устойчивых к ДВ, остаётся актуальной разработка методов их выявления, в том числе молекулярно-генетических.

Целью исследования была разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для выявления у грамположительных бактерий генов *qacA/B* и *smr* — детерминант устойчивости к ДВ из группы катионных поверхностно-активных веществ (КПАВ).

Материалы и методы. Поиск консервативных участков генов *qacA*, *qacB* и *smr* и разработку праймеров и зондов проводили с помощью программ BLASTN, GeneRunner и Multiple Primer Analyzer. Для оценки аналитической чувствительности мультиплексной ПЦР-РВ были сконструированы плазмиды pTZ57-*qacA/B*, pTZ57-*smr* и pTZ57-16S, содержащие фрагменты генов *qacA/B*, *smr* и 16S рРНК длиной 197, 127 и 287 п. н. соответственно. Апробацию метода проводили с использованием клинических изолятов грамположительных бактерий ($n = 30$).

Результаты. Разработана мультиплексная ПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan для выявления генов *qacA/B* и *smr* у грамположительных бактерий. В качестве внутреннего контроля амплификации был использован ген 16S рРНК. Чувствительность мультиплексной ПЦР-РВ составила 10^3 копий для всех генов. Апробация мультиплексной ПЦР-РВ показала, что гены *qacA/B* присутствовали у 30% исследованных изолятов, *smr* — у 10%. Воспроизводимость результатов тестирования составила 100%. Специфичность разработанной мультиплексной ПЦР-РВ составила 100%.

Заключение. Разработанная мультиплексная ПЦР-РВ характеризуется высокой специфичностью и быстротой анализа, а также наличием внутреннего контроля амплификации и может быть использована для выявления грамположительных бактерий, потенциально устойчивых к ДВ из группы КПАВ, при проведении молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: дезинфектанты, устойчивость, *qacA/B*, *smr*, ПЦР в реальном времени

Источник финансирования. Работа финансировалась Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Государственное задание № 122030900064-9).

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

Для цитирования: Ковальчук С.Н., Архипова А.Л., Ковылкова С.Ю., Ильина Е.Н., Федорова Л.С. Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени для выявления генов *qacA/B* и *smr* у грамположительных бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):692–698.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-574>

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

Multiplex real-time PCR for detection of *qac A/B* and *smr* genes in Gram-positive bacteria

Svetlana N. Kovalchuk[✉], Anna L. Arkhipova, Svetlana Yu. Kovytkova, Elena N. Ilina, Lyudmila S. Fedorova

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia

Abstract

Background. Disinfectants are effective means of non-specific prevention of infections associated with the provision of medical care. Violation of disinfectant use regimes leads to the formation of microorganism resistance to them. To monitor the spread of clinically significant microorganisms resistant to disinfectants, the development of methods for their detection, including molecular genetic methods, remains relevant.

The aim of the study was to develop a multiplex real-time PCR for the identification of *qacA/B* and *smr* genes, the determinants of resistance to cationic biocides, in Gram-positive bacteria.

Materials and methods. Conserved regions of *qacA*, *qacB* and *smr* genes were searched, and primers and probes were designed using BLASTN, GeneRunner, and Multiple Primer Analyzer programs. To evaluate the analytical sensitivity of the multiplex PCR, plasmids pTZ57-*qacA/B*, pTZ57-*smr*, and pTZ57-16S containing *qacA/B*, *smr* and 16S rRNA gene fragments of 197 bp, 127 bp, and 287 bp, respectively, were constructed. The method was tested on clinical isolates of Gram-positive bacteria ($n = 30$).

Results. A multiplex real-time PCR using TaqMan probes was developed for the detection of *qacA/B* and *smr* genes in Gram-positive bacteria. The 16S rRNA gene was used as an internal amplification control. The sensitivity of the multiplex PCR was 10^3 copies for all genes. Multiplex PCR validation showed that *qacA/B* genes were present in 30%, *smr* genes were present in 10% of the isolates tested. The reproducibility of the results was 100%.

Conclusion. The developed multiplex PCR differs from existing assays by high specificity and short turnaround time, as well as by the presence of an internal amplification control. It can be used for the detection of Gram-positive bacteria potentially resistant to cationic biocides.

Keywords: *disinfectants, resistance, qacA/B, smr, real-time PCR*

Funding source. The work was financed by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (State Assignment No. 122030900064-9).

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

For citation: Kovalchuk S.N., Arkhipova L.S., Kovytkova S.Yu., Ilina E.N., Fedorova L.S. Multiplex real-time PCR for detection of *qac A/B* and *smr* genes in Gram-positive bacteria. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):692–698.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-574>

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

Введение

Распространение в последние десятилетия штаммов патогенных бактерий, устойчивых к антимикробным препаратам и дезинфицирующим веществам (ДВ), — одна из острых проблем современного здравоохранения. ДВ являются одним из наиболее эффективных средств при проведении неспецифической профилактики инфекционных заболеваний и играют ведущую роль в системе мер по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, а также широко используются на предприятиях общественного питания, пищевой промышленности, на коммунальных объектах, в образовательных учреждениях и в быту. Однако

наблюдаемый с 1950-х гг. феномен устойчивости микроорганизмов к ДВ приводит к резкому снижению эффективности дезинфекционных мероприятий [1], что связано с использованием неэффективных режимов их применения, приводящим к формированию устойчивости микроорганизмов к ДВ, а также к перекрестной устойчивости к антибиотикам в силу наличия общих механизмов действия [2, 3].

Катионные поверхностно-активные вещества (КПАВ), к которым относятся четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), производные гуанидина и третичные амины, являются наиболее часто используемыми ДВ [4, 5]. В 2023 г. ЧАС занимали

наибольшую долю ДВ на мировом рынке¹, и сохранение этой тенденции прогнозируется на ближайшие 10 лет². Согласно имеющимся данным, на российский рынок их доля составляет 50–70% [6, 7].

Основным механизмом формирования микробной резистентности к ЧАС является снижение их внутриклеточной концентрации за счёт выведения из клетки с помощью эффлюксных насосов [5, 8], которые на основе структурного сходства и особенностей функционирования объединены в 6 суперсемейств:

- 1) RND (Resistance-Nodulation Division);
- 2) SMR (Small Multidrug Resistance);
- 3) MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion);
- 4) MFS (Major Facilitator Superfamily);
- 5) ABC (ATP Binding Cassette);
- 6) PACE (Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux) [9, 10].

Устойчивость к ЧАС грамположительных бактерий в основном связана с эффлюксными насосами QacA, QacB (суперсемейство MFS), а также Smr (QacC), QacG, QacH и QacJ, относящимися к надсемейству SMR [11, 12]. Мониторинг распространённости этих эффлюксных насосов среди грамположительных бактерий с помощью молекулярно-генетических методов ведётся во многих странах и показал, что наиболее часто встречаются гены *qacA*, *qacB* и *smr* [13–16]. При этом информация о распространении этих генов среди российских изолятов грамположительных бактерий практически отсутствует. Лишь в одной публикации были представлены данные о наличии генов *qacA* и *qacB* у изолятов стафилококков, выделенных из смывов с поверхностей в общественных местах Новосибирска [17]. С учётом того, что гены *qacA*, *qacB* и *smr* имеют преимущественно плазмидную локализацию, они могут широко распространяться посредством горизонтального переноса, приводя к формированию приобретённой устойчивости к КПАВ у грамположительных бактерий [12].

Целью исследования была разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с флуоресцентно-мечеными зондами для выявления генов *qacA/B* и *smr* у грамположительных бактерий.

¹ Global antiseptics and disinfectants market size, share, trends & growth forecast report — segmented by type (alcohol and aldehyde, phenols and derivatives, biguanides and amides, quaternary ammonium compounds, iodine compounds and others), end user (domestic user and institutional user) and region — industry forecast from 2024 to 2029. URL: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/antiseptics-and-disinfectants-market> (дата обращения 23.10.2024).

² Global antiseptics and disinfectants market size to exceed USD 79.25 Billion by 2033 | CAGR of 10.67%. URL: <https://finance.yahoo.com/news/global-antiseptics-disinfectants-market-size-160000859.html> (дата обращения 23.10.2024).

Материалы и методы

Бактериальные изоляты

В исследовании были использованы изоляты грамположительных бактерий видов *Staphylococcus aureus* ($n = 12$), *S. haemolyticus* ($n = 6$), *Enterococcus faecium* ($n = 6$) и *E. faecalis* ($n = 4$), *Streptococcus parasanguinis* ($n = 1$) и *S. epidermidis* ($n = 1$), полученные от медицинских учреждений Москвы. Изоляты выделены из смывов, взятых с объектов внутрибольничной среды — поверхностей аппаратов ИВЛ и УЗИ, прикроватных тумбочек, поручней кроватей. Бактерии культивировали в течение 16 ч при 37°C в ГРМ-бульоне (ГНЦ ПМБ). Видовую принадлежность изолятов определяли с помощью масс-спектрометра «SMART MS 5020» («Zhuhai DL Biotech Co., Ltd»).

Выделение ДНК

ДНК выделяли из бактериальной культуры с помощью набора для выделения ДНК «ExtractDNA Blood & Cells» (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя и хранили при –20°C. Концентрацию образцов ДНК определяли с помощью спектрофотометра «NanoDrop 2000C» («ThermoFIS»).

Разработка праймеров и зондов

Нуклеотидные последовательности генов эффлюксных насосов *qacA*, *qacB*, *smr* и 16S рРНК грамположительных бактерий были взяты из базы данных GenBank³. Их анализ проводили с помощью программы BLASTN⁴. Праймеры и зонды были разработаны на основе консервативных участков генов с использованием программ «GeneRunner v. 62.2.55 Beta»⁵ и «Multiple Primer Analyzer»⁶.

Проведение мультиплексной ПЦР-РВ

Мультиплексную ПЦР-РВ проводили в объёме 25 мкл в 96-луночных планшетах для ПЦР с использованием амплификатора «CFX96 Real-Time System» («Bio-Rad Laboratories, Inc.»). Реакционная смесь включала в себя 5× буфер и 2,5 ЕД Taq-полимеразы (ООО «НПФ Литех»), праймеры (по 0,5 мкМ каждого), зонды TaqMan (по 0,25 мкМ каждого; **таблица**) и образец ДНК (5 нг). Зонды TaqMan синтезированы ООО «ДНК-синтез», праймеры — ЗАО «Евроген». Профиль реакции: 95°C — 2 мин, 95°C — 15 с, 56°C — 20 с (36 циклов), 72°C — 30 с.

Определение аналитической чувствительности мультиплексной ПЦР-РВ

Для оценки аналитической чувствительности метода сконструированы плазмиды pTZ57-*qacA/B*,

³ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

⁴ URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁵ URL: <http://www.generunner.net>

⁶ URL: <https://www.thermofisher.com>

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов
Nucleotide sequences of the primers and probes

Гены Genes	Нуклеотидная последовательность (5'–3') Nucleotide sequence (5'–3')	Размер, п. н. Size, bp
<i>qacA/B</i>	<i>qacA/B</i> -D: 5'-CTGGCTTATACCTATTACCTA-3' <i>qacA/B</i> -R: 5'-TCCAACATAAATTAATGCTAAAG-3' <i>qacA/B</i> -Pb: 5'-HEX- CGATTTGGACCGAAAAATAGTGTAC-BHQ1	197
<i>smr</i>	<i>smr</i> -F: AGTAAACAATGCAACACCTAC-3' <i>smr</i> -R: ATACTATAGTTATTAGATTTATTTG-3' <i>smr</i> -Pb: 5'-FAM-TTAGTCTTAACAACCGTAGTCTCAAT-BHQ1	127
16S рPHK 16S rRNA	16S-D: 5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3' Bakt_805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' 16S-Pb: Cy5-5'-TGTAGCGGTGAAATGCG- BHQ2	287

pTZ57-*smr* и pTZ57-16S, содержащие фрагменты генов *qacA/B*, *smr* и 16S рPHK длиной 197, 127 и 287 п. н. соответственно. Клонирование проводили с использованием набора реактивов «InsTAclone PCR Cloning Kit» («ThermoFS») согласно рекомендациями производителя. Оценку концентраций плазмид проводили с помощью набора «Spectra Q BR» (ООО «Сесана») и флуориметра «Qubit» («ThermoFS»). Секвенирование полученных плазмид проводили по методу Сэнгера. Путём 10-кратных разведений получены образцы плазмид pTZ57-*qacA/B*, pTZ57-*smr* и pTZ57-16S с концентрацией 10¹–10⁶ копий в 1 мкл, которые использовались в качестве матрицы для ПЦР-РВ. Анализ результатов проводили при помощи программного обеспечения к прибору «CFX96 Real-Time System» («Bio-Rad Laboratories, Inc.»).

Апробация и валидация метода

Апробацию мультиплексной ПЦР-РВ проводили с использованием ДНК, выделенной из изолятов грамположительных бактерий ($n = 30$). Для оценки вариабельности значений порогового цикла ПЦР (C_q) каждый образец тестировали в 3-кратной повторности и рассчитывали средние значения C_q, стандартные отклонения (SD) и коэффициент вариабельности (C_v, %). Полученные ампликоны генов *qacA/B* и *smr* проанализированы с помощью электрофорезного разделения в 1,5% агарозном геле и секвенированы по методу Сэнгера. Для валидации мультиплексной ПЦР-РВ использовали описанные ранее методы ПЦР с электрофоретической детекцией фрагментов генов *qacA/B* [18] и *smr* [19].

Результаты

Для мультиплексной ПЦР-РВ разработаны праймеры и зонды типа TaqMan, комплементарные высококонсервативным участкам генов *qacA*, *qacB* и *smr* (таблица), которые были выявлены на основе множественного выравнивания всех полноразмерных нуклеотидных последовательностей этих генов, имеющихся в базах данных GenBank,

EMBL⁷ и DDBJ⁸. Проанализировано 302 нуклеотидных последовательности генов *qacA/B* и 220 последовательностей гена *smr*. Анализ генов *qacA* и *qacB* показал, что они различались 8 нуклеотидами, поэтому для них разработаны общие праймеры и зонд.

При проведении тестирования методом ПЦР важным является использование внутреннего контроля амплификации, который позволяет исключить ложноотрицательные результаты вследствие отсутствия или недостаточного для детекции количества ДНК в реакционной смеси. В качестве эндогенного внутреннего контроля амплификации в разработанной мультиплексной ПЦР-РВ использован ген 16S рPHK. Праймер 16S-D и зонд были разработаны на основе анализа 5000 последовательностей 16S рPHK (таблица). В качестве обратного праймера использовали универсальный праймер Bakt_805R, разработанный ранее [20].

С помощью разработанных нами праймеров проведён поиск изолятов грамположительных бактерий ($n = 30$), содержащих гены *qacA/B* и *smr*. Полученные ампликоны были проанализированы с помощью электрофорезного разделения в 1,5% агарозном геле. Длины ампликонов генов *qacA/B* и *smr* соответствовали ожидаемым (таблица; рис. 1). Специфичность праймеров была подтверждена секвенированием ампликонов по методу Сэнгера.

Для оценки аналитической чувствительности мультиплексной ПЦР-РВ сконструированы плазмиды pTZ57-*qacA/B*, pTZ57-*smr* и pTZ57-16S, содержащие полученные ампликоны генов *qacA/B*, *smr* и 16S рPHK. С помощью 10-кратных разведений получены их образцы с концентрацией от 10¹ до 10⁶ копий в 1 мкл, которые использовались в качестве матрицы для разработанной мультиплексной ПЦР-РВ. Чувствительность мультиплексной ПЦР-РВ составила 10³ копий для всех генов. Эффективность амплификации генов *qacA/B*, *smr* и

⁷ URL: <https://www.embl.org>

⁸ URL: <https://www.ddbj.nig.ac.jp>

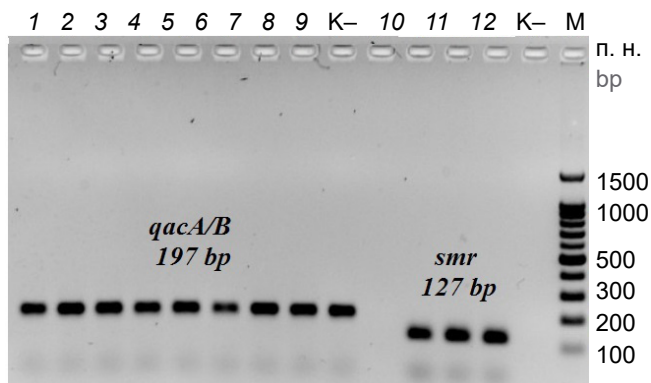


Рис. 1. Результаты амплификации фрагментов генов *qacA/B* и *smr*.

1–9 — *qacA/B*-положительные изоляты; 10–12 — *smr*-положительные изоляты. К — отрицательный контроль. М — маркер длин ДНК.

Fig. 1. Results of the amplification of *qacA/B* and *smr* genes.

1–9 — *qacA/B*-positive isolates; 10–12 — *smr*-positive isolates. К — negative control. М — DNA length marker.

16S рРНК при составила 95,1, 91,3 и 101,8% соответственно (**рис. 2**).

Апробацию разработанной мультиплексной ПЦР-РВ проводили с использованием 30 клинических изолятов грамположительных бактерий, полученных от медицинских учреждений Москвы. Тестирование проводили в 3 повторах. Выявлено, что 30% изолятов (6 изолятов *S. haemolyticus* и по 1 изоляту *E. faecium*, *E. faecalis* и *S. parasanguinis*) имели гены *qacA/B* и 10% изолятов (2 изолята *S. haemolyticus* и изолят *S. epidermidis*) содержали ген *smr*. У 2 изолятов *S. haemolyticus* были найдены и *qacA/B*, и *smr*. Воспроизводимость результатов тестирования для всех образцов составила 100%, коэффициент варируемости значений C_q — от 3,4 до 6,2%. Результаты мультиплексной ПЦР-РВ пол-

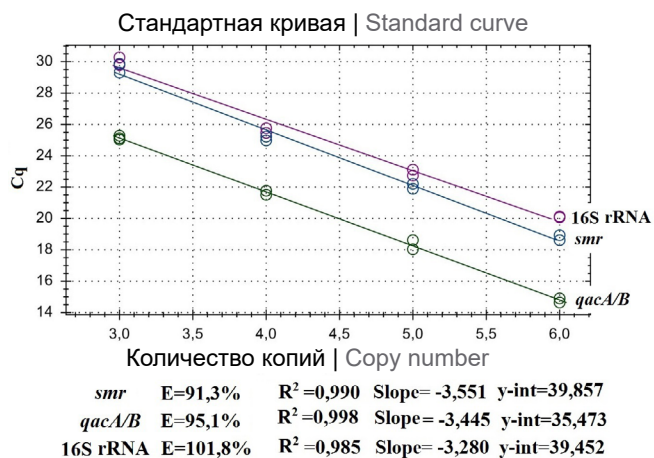


Рис. 2. Результаты определения чувствительности мультиплексной ПЦР-РВ для выявления генов *qacA/B* и *smr* у грамположительных бактерий.

Fig. 2. Results of multiplex PCR sensitivity evaluation for detection of *qacA/B* and *smr* genes in gram-positive bacteria.

ностью совпали как с данными моноплексных ПЦР с электрофорезной детекцией, так и с результатами секвенирования ампликонов по методу Сэнгера. В качестве альтернативного метода сравнения для разработанной нами мультиплексной ПЦР-РВ использованы методы ПЦР с электрофоретической детекцией генов *qacA/B* и *smr*, предложенные ранее К.Н. Лин и соавт. [18] и N. Noguchi и соавт. [19] соответственно. Результаты, полученные с помощью этих методов, также полностью совпали. Таким образом, специфичность разработанной нами мультиплексной ПЦР-РВ с флуоресцентно-мечеными зондами составила 100%.

Обсуждение

Выявление генов резистентности методами ПЦР является широко распространенным и доступным методом их мониторинга. Анализ источников литературы показал, что на сегодняшний день было предложено несколько методов детекции генов *qacA/B* и *smr* на основе ПЦР с электрофоретической детекцией результатов [9, 14, 21–23] и ПЦР-РВ с использованием интеркалирующих ДНК-красителей [18, 24], однако эти методы имеют ряд недостатков, связанных с длительностью тестирования и надёжностью результатов. Метод ПЦР с электрофоретической детекцией требует проведения гель-электрофореза, что увеличивает продолжительность анализа по сравнению с ПЦР-РВ и делает его трудоёмким и неудобным для проведения тестирования большого количества клинических изолятов. ПЦР с использованием интеркалирующих красителей позволяет проводить детекцию ампликонов в режиме реального времени, что сокращает продолжительность тестирования по сравнению с предыдущим методом, однако может давать ложноположительные результаты, поскольку интеркалирующие красители связываются со всеми двухцепочечными ДНК, включая димеры праймеров и возможные неспецифические продукты ПЦР, что требует тщательного подбора праймеров и соблюдения условий проведения ПЦР, включая используемые реактивы [25]. Нами была разработана мультиплексная ПЦР-РВ, которая лишена недостатков вышеупомянутых методов за счёт использования флуоресцентно-меченых зондов TaqMan, а также наличия внутреннего контроля амплификации.

Заключение

Разработана мультиплексная ПЦР-РВ с флуоресцентно-мечеными зондами для выявления генов *qacA/B* и *smr* грамположительных бактерий, которая отличается от существующих методов простотой и быстротой анализа, а также наличием внутреннего контроля амплификации, что позволяет исключить получение ложноотрицательных результатов тестирования. Разработанная мультиплексная

ПЦР-РВ может быть использована для проведения мониторинга распространённости генов *qacA/B* и *smr*-устойчивости к КПАВ для выявления потенциально устойчивых к ним изолятов грамположительных бактерий. Однако следует учитывать, что все молекулярно-генетические тест-системы являются прогностическим инструментом и не исключают необходимости подтверждения фенотипа устойчивости микробиологическими методами.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Chaplin C.E. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. *J. Bacteriol.* 1952;63(4):453–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.63.4.453-458.1952>
2. Mc Carlie S., Boucher C.E., Bragg R.R. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug. Resist. Updat.* 2020;48:100672. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.100672>
3. Ковальчук С.Н., Федорова Л.С., Ильина Е.Н. Молекулярные механизмы микробной устойчивости к дезинфицирующим средствам. *Антибиотики и химиотерапия.* 2023;68(1-2): 45–56. Kovalchuk S.N., Fedorova L.S., Ilina E.N. Molecular mechanisms of microbial resistance to disinfectants. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2023;68(1-2):45–56. DOI: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-1-2-45-56> EDN: <https://elibrary.ru/hycybo>
4. Merchel Piovesan Pereira B., Tagkopoulos I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019;85(13):e00377–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00377-19>
5. Fox L.J., Kelly P.P., Humphreys G.J., et al. Assessing the risk of resistance to cationic biocides incorporating realism-based and biophysical approaches. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2022; 49(1):kuab074. DOI: <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab074>
6. Благонравова А.С., Ковалишена О.В., Саперкин Н.В. Маркетинговое исследование госпитального сегмента регионального рынка средств дезинфекции в медицинских учреждениях. *Медицинский альманах.* 2011;(4):143–5. Blagonravova A.S., Kovalishena O.V., Saperkin N.V. Marketing examination of hospital segment of regional market of disinfectants in medical establishments. *Medical Almanac.* 2011;(4):143–5. EDN: <https://elibrary.ru/nujlqz>
7. Тарасова Е.Ю., Трemasова А.М., Хузин Д.А. и др. Анализ рынка дезинфицирующих средств, используемых в отдельных животноводческих хозяйствах Приволжского федерального округа. *Ветеринарный врач.* 2022;(3):58–66. Tarasova E.Yu., Tremasova A.M., Khuzin D.A., et al. Analysis of the disinfectants market used in some livestock farms of the Volga federal district. *Veterinarian.* 2022;(3):58–66. DOI: https://doi.org/10.33632/1998-698X.2021_58_66 EDN: <https://elibrary.ru/vfvanq>
8. Boyce J.M. Quaternary ammonium disinfectants and antiseptics: tolerance, resistance and potential impact on antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2023;12(1):32. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01241-z>
9. Hernando-Amado S., Blanco P., Alcalde-Rico M., et al. Multi-drug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug. Resist Updat.* 2016;28:13–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.06.007>
10. Hassan K.A., Liu Q., Elbourne L.D.H., et al. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Res. Microbiol.* 2018;169(7-8): 450–4. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.001>
11. LaBreck P.T., Bochi-Layec A.C., Stanbro J., et al. Systematic analysis of efflux pump-mediated antiseptic resistance in *Staphylococcus aureus* suggests a need for greater antiseptic stewardship. *mSphere.* 2020;5(1):e00959–19. DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00959-19>
12. Chieffi D., Fanelli F., Fusco V. Antimicrobial and biocide resistance in *Staphylococcus aureus*: genomic features, decontamination strategies, and the role of *S. aureus* complex-related species, with a focus on ready-to-eat food and food-contact surfaces. *Front. Food. Sci. Technol.* 2023;3:1165871. DOI: <https://doi.org/10.3389/frfst.2023.1165871>
13. Ignak S., Nakipoglu Y., Gurler B. Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2017;6:88. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0244-6>
14. El Sayed Zaki M., Bastawy S., Montasser K. Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019;17:94–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.022>
15. Ghasemzadeh-Moghaddam H., Azimian A., Bayani G., et al. High prevalence and expression of antiseptic resistance genes among infectious t037/ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in North Khorasan Province, Iran. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2022;25(6):775–80. DOI: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2022.63780.14055>
16. Sommer L.M., Krauss J.L., Hultén K.G., et al. The prevalence of antiseptic tolerance genes among staphylococci and enterococci in a pediatric population. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2019;40(3):333–40. DOI: <https://doi.org/10.1017/ice.2019.3>
17. Юшкевич Е.А. Поиск генов QacA и QacB, опосредующих устойчивость к хлоргексидину, у штаммов рода *Staphylococcus*. В кн.: Алешковский И.А., Андриянов А.В., Антипов Е.А., ред. *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020»*. М.;2020. Yushkevich E.A. Search for QacA and QacB genes describing chlorhexidine resistance in a strain of the genus *Staphylococcus*. In: Aleshkovsky I.A., Andriyanov A.V., Antipov E.A., eds. *Materials of the International Youth Scientific Forum «Lomonosov-2020»*. Moscow;2020.
18. Lin K.H., Lin C.Y., Huang C.C., et al. Differentiation of *qacA* and *qacB* using high-resolution melt curve analysis, and both *qacA* and *qacB* but not *qacC* or *norA* types increase chlorhexidine minimal inhibitory concentrations in *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020;53(6):900–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.09.006>
19. Noguchi N., Suwa J., Narui K., et al. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *J. Med. Microbiol.* 2005;54 (Pt. 6):557–65. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45902-0>
20. Herlemann D.P., Labrenz M., Jürgens K., et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 2011;5(10):1571–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
21. Smith K., Gemmell C.G., Hunter I.S. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;61(1):78–84. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm395>
22. Bjorland J., Steinum T., Kvitle B., et al. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(9):4363–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4363-4368.2005>
23. Alam M.M., Kobayashi N., Uehara N., Watanabe N. Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes *qacA* and *qacB* in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* 2003;9(2):109–21. DOI: <https://doi.org/10.1089/107662903765826697>
24. Chan M.K.L., Koo S.H., Quek Q., et al. Development of a real-time assay to determine the frequency of *qac* genes in methi-

cillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Methods*. 2018;153:133–8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.017>

Информация об авторах

Ковальчук Светлана Николаевна[✉] — к. б. н., с. н. с. лаб. преодоления микробной резистентности Института системной биологии и медицины, Москва, Россия, s.n.kovalchuk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5029-0750>

Архипова Анна Леонидовна — м. н. с. лаб. преодоления микробной резистентности Института системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8835-6671>

Ковылкова Светлана Юрьевна — специалист лаб. преодоления микробной резистентности Института системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0003-5668-7622>

Ильина Елена Николаевна — д. б. н., профессор РАН, член-корреспондент РАН, г.н.с., зав. лаб. математической биологии и биоинформатики Института системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0130-5079>

Федорова Людмила Самуиловна — д. м. н., профессор, зав. лаб. преодоления микробной резистентности Института системной биологии и медицины, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2663-0273>

Участие авторов: *Ковальчук С.Н.* — концепция и дизайн исследования, организация сбора и обработки материала, написание текста; *Архипова А.Л., Ковылкова С.Ю.* — сбор и обработка материала; *Федорова Л.С., Ильина Е.Н.* — 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 14.08.2024;
принята к публикации 10.10.2024;
опубликована 29.10.2024

25. Law J.W., Ab Mutalib N.S., Chan K.G., Lee L.H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.* 2015;5:770. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>

Information about the authors

Svetlana N. Kovalchuk[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory for overcoming microbial resistance, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, s.n.kovalchuk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5029-0750>

Anna L. Arkhipova — junior researcher, Laboratory for overcoming microbial resistance, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8835-6671>

Svetlana Yu. Kovytkova — specialist, Laboratory for overcoming microbial resistance, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0003-5668-7622>

Elena N. Ilyina — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Corresponding Member, principal researcher, Head, Laboratory of Mathematical Biology and Bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0130-5079>

Lyudmila S. Fedorova — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory for overcoming microbial resistance, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2663-0273>

Author contribution: *Kovalchuk S.N.* — concept and design of the study, organization of collection and processing of material, writing of the text; *Arkhipova A.L., Kovytkova S.Yu.* — collection and processing of material; *Fedorova L.S., Ilyina E.N.* — 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 14.08.2024;
accepted for publication 10.10.2024;
published 29.10.2024

ОБЗОРЫ

Научный обзор
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-581>



Определение чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков и фагов: обзор литературы

Пунченко О.Е.^{1, 2✉}, Пунченко Е.В.³, Гостев В.В.^{1, 4}, Савченко М.В.¹

¹Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Цель обзора — дать описание существующих лабораторных методов для определения чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков и бактериофагов.

Бактериофаги до сих пор рассматриваются некоторыми исследователями как альтернатива антибиотикам. Но всё чаще встречаются научные работы, в которых их совместное действие описывается в виде синергизма. Механизмы этого явления до конца не изучены, однако доказано, что в синергию с антибиотиками могут вступать не только вирулентные, но и умеренные фаги, позволяя снизить минимальную подавляющую концентрацию антибиотика в несколько раз. Поскольку синергию эмпирически пока предсказать невозможно, в микробиологических лабораториях используют различные методы *in vitro*, большинство из которых являются трудоёмкими. Актуальна разработка новой методики, которая может быть внедрена в ежедневную практику микробиологических лабораторий.

Ключевые слова: *резистентность, чувствительность, антибиотик, бактериофаг, синергия*

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: Пунченко О.Е., Пунченко Е.В., Гостев В.В., Савченко М.В. Определение чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков и фагов: обзор литературы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):699–705.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-581>

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

Review
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-581>

Study of bacterial susceptibility to antibiotic and phage combinations: a literature review

Olga E. Punchenko^{1, 2✉}, Elizaveta V. Punchenko³, Vladimir V. Gostev^{1, 4}, Marina V. Savchenko¹

¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia;

²Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia;

³ITMO University, St. Petersburg, Russia;

⁴Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia

Abstract

The aim of the review is to describe existing laboratory methods for determining the sensitivity of bacteria to a combination of antibiotics and bacteriophages. However, more and more often there are scientific papers in which their combined action is described as synergism. The mechanisms of this phenomenon have not been fully studied, but it has been proven that not only virulent but also moderate phages can enter into synergy with antibiotics, allowing the minimum inhibitory concentration of the antibiotic to be reduced several times. Since

synergy cannot yet be empirically predicted, microbiological laboratories use various *in vitro* methods, most of which are labor-intensive. The development of a new technique that can be introduced into the daily practice of microbiological laboratories is relevant.

Keywords: *resistance, susceptibility, antibiotic, bacteriophage, synergy*

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Punchenko O.E., Punchenko E.V., Gostev V.V., Savchenko M.V. Study of bacterial susceptibility to antibiotic and phage combinations: a literature review. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):699–705.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-581>

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

Введение

В последние годы проблема устойчивости микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотикам становится всё более острой, а широкое распространение резистентных к ним патогенов вызывает обеспокоенность клиницистов по всему миру. Среди этиологически значимых бактерий выделяют группу ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), для которых характерно разнообразие механизмов резистентности к противомикробным препаратам. В мае 2024 г. Всемирная организация здравоохранения опубликовала обновлённый список бактериальных патогенов, устойчивых к антибиотикам, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. В зависимости от потребности в создании новых противомикробных препаратов и новых способов лечения микроорганизмы распределены по группам приоритетности. К критически высокому уровню отнесены резистентные к карбапенемам *A. baumannii* и микроорганизмы, входящие в состав порядка *Enterobacterales*, включая продуцентов β-лактамаз расширенного спектра. К высокоприоритетным патогенам отнесены *Salmonella* spp. и *Shigella* spp., устойчивые к фторхинолонам, *E. faecium*, устойчивые к ванкомицину, *P. aeruginosa*, устойчивые к карбапенемам, *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивые к цефалоспорином третьего поколения и/или фторхинолонам, и метициллин-резистентные *S. aureus*. К среднему уровню приоритетности отнесены *Streptococcus* группы А и *S. pneumoniae*, устойчивые к макролидам, *Haemophilus influenzae*, устойчивые к ампициллину, *Streptococcus* группы В, устойчивые к пенициллину¹. В России в 2017 г. принята Стратегия предупреждения и распространения резистентности на

период до 2030 г., в которой предусмотрено внедрение современных методов изучения механизмов её формирования, мониторинга распространения и пути сдерживания. Особое значение и внимание уделено ESCAPE-патогенам в СанПиН 3.3686-21 как основным возбудителям инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи². С учётом растущей резистентности бактерий к химиопрепаратам назрела необходимость внедрения альтернативных подходов к лечению вызываемых ими заболеваний. Взамен антибиотиков разные авторы предлагают использовать пробиотики, микробные ферменты, бактериоцины, бактериофаги и их лизины, синтетические фаги, вакцины, сыворотки и другие биопрепараты [1–6].

Наиболее перспективными в этом перечне выглядят фаги — вирусы бактерий, т. к. они не оказывают токсического действия на клетки макроорганизма и не подавляют иммунитет, поэтому для их назначения практически отсутствуют противопоказания. При этом они обладают узконаправленным действием и не вызывают негативных изменений в составе микробиоты человека. В отличие от других противомикробных препаратов, бактериофаги способны преодолевать развившуюся к ним невосприимчивость бактерий, используя несколько стратегий. По сравнению с β-лактамами антибиотиками, которые вызывают гибель микробных клеток в течение 3 ч, лизис бактерий под действием фагов может происходить менее чем за 10 мин. Однако, в отличие от антибиотиков, действие бактериофагов не приводит к кумулятивному накоплению эндотоксина при разрушении грамотрицательных бактерий [7].

Единственным в России производителем лекарственных бактериофагов является НПО «Ми-

¹ Список приоритетных бактериальных патогенов. URL: <https://www.who.int/ru/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health> (дата обращения: 05.08.2024).

² Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 “Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней”».

кроген», выпускающее более 14 уникальных препаратов. На сегодняшний день на рынке представлены бактериофаги, активные в отношении не только ESCAPE-патогенов, но и возбудителей диарейных заболеваний — шигеллёзов, сальмонеллёзов, эшерихиозов. Препараты фагов выпускаются или как комбинированные — против нескольких родов бактерий, или как монопрепараты, специфичные против конкретного вида возбудителя. Необходимо отметить, что в России применение бактериофагов закреплено в нормативных документах, в то время как в большинстве стран Европы и Азии, Австралии, США только недавно начали разрабатывать регулирующие применение фагов документы [8, 9].

Большинство исследований показали высокую эффективность и безопасность тестируемых фагов, в том числе против приоритетных бактериальных патогенов [10]. Фаготерапия без использования антибиотиков привела к успеху в борьбе с ванкомицин-резистентными энтерококками, метициллин-резистентными стафилококками (MRSA и MRSE) [11]. В редких случаях были описаны явления антагонизма при совместном назначении антибиотика и бактериофага [10]. Поэтому перед их назначением должно обязательно проводиться определение чувствительности конкретного штамма к антимикробным препаратам. В России определение чувствительности бактерий к бактериофагам регламентировано методическими рекомендациями по рациональному использованию бактериофагов³, к антибиотикам — клиническими рекомендациями⁴. В связи с этим ставится актуальный вопрос об определении чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков и фагов в микробиологических лабораториях.

Цель обзора — описать существующие лабораторные методы по совместному определению чувствительности бактерий к антибиотикам и бактериофагам.

Объединённое действие фага и антибиотика впервые было описано Neter и Clark в 1944 г. на примере *S. aureus* и пенициллина. В 2004 г. появились результаты экспериментов на куриной модели, посвящённые изучению взаимодействия фага и энрофлоксацина против *Escherichia coli*, проведенные Huff и соавт., а спустя несколько лет А.М. Сомеау с исследовательской группой провели тестирование *in vitro* и заметили, что субингибирующие концентрации отдельных антибиотиков могут влиять на выработку вирулентных фагов, инфицирующих *E. coli*. Авторы дали название этому феномену —

«синергия фага и антибиотика» (Phage-Antibiotic Synergy, PAS). Долгое время механизм синергии оставался неизвестным, пока с помощью электронной микроскопии не изучили обработанные антибиотиком и фагом культуры бактерий. Было установлено, что химиопрепараты, нарушающие синтез пептидогликана, приводят к удлинению бактериальных клеток, что способствует репликации фага и, вероятно, активному прикреплению его к бактерии из-за увеличения поверхности клеточной стенки [12–14].

Феномен PAS широко изучали во многих лабораториях, в результате чего были получены подтверждения синергизма для различных комбинаций фагов с антибиотиками разных фармакологических групп. Однако методы, используемые для оценки этих взаимодействий, до сих пор не унифицированы, поэтому подходы у разных исследователей имеют существенные различия. Самым простым выходом из ситуации представляется заимствование метода, используемого при изучении взаимодействия разных классов антибиотиков, т. к. комбинированная противомикробная терапия назначается пациентам с бактериемией, пневмонией, хирургической инфекцией, а также пациентам с септическим шоком в отделениях интенсивной терапии. На сегодняшний день описаны 4 метода, с помощью которых синергию химиопрепаратов возможно оценить *in vitro*: метод «шахматной доски»; комбинированное тестирование бактерицидного действия нескольких антимикробных препаратов; E-test; анализ графика гибели бактерий в зависимости от времени действия антибиотика, так называемый time-kill assays [15]. Среди доступных методов определения синергизма «золотым» стандартом является time-kill assays [16, 17], который впервые был применён именно для подтверждения синергизма фага и антибиотика⁵. Обнаруженные *in vitro* взаимодействия рассчитывают и интерпретируют как синергические, аддитивные, индифферентные или антагонистические в зависимости от того, является ли антибактериальная активность препаратов в комбинации большей, эквивалентной или меньшей, чем активность препаратов, применяемых по отдельности.

Разведения в бульоне

При этом методе используют 96-луночные планшеты, в лунках которых проводят совместное культивирование бульонной взвеси бактерий, антибиотика и фага. Предварительно изучают активность фага и минимальную подавляющую кон-

³ Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике: Методические рекомендации. М.;2022.

⁴ Российские рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Смоленск;2024.

⁵ International Organisation for Standardization. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial testing devices. 2019;Part 1. URL: <https://iso.org/standard/70464.html>

центрацию (МПК) антибиотика, т. к. для изучения синергии используют их субингибирующие концентрации. Результат оценивают, измеряя кинетику роста по оптической плотности (ОП) с помощью спектрофотометра или по метаболизму бактерий после их окрашивания тетразолием, который меняет цвет в ответ на клеточное дыхание. Оценка результата с помощью прибора в режиме реального времени позволяет определить время, затраченное на частичное ингибирование, выявить поздний лизис и возобновление роста бактерий. Однако только по ОП невозможно сделать вывод о жизнеспособности бактерий и отличить погибшие (еще не разрушенные бактерии) от живых. Дополнительное окрашивание исключает ошибку и позволяет обнаружить только метаболически активные (живые) бактерии. С одной стороны, этот метод даёт возможность не только тестировать любые сочетания антибиотиков и бактериофагов, но и изменять их концентрацию. С другой стороны, необходимо учитывать, что использование одной концентрации антибиотика (половина от предварительно известной МПК) и фага (ниже лизирующей по Аппельману) не всегда позволяет сделать вывод об их взаимодействии и выявить закономерность. В то же время, используя более трудоёмкий способ, комбинируя несколько концентраций антибиотика и фага, можно найти те сочетания двух антимикробных препаратов, при которых будет наблюдаться их синергия [18, 19]. Некоторыми исследователями феномен PAS был достигнут даже при разведении антибиотика в 4, 10 и 100 раз от МПК и в 100 и 1000 раз фага от его исходной концентрации [20].

В некоторых случаях для изучения синергии возможно использование бактериофага, лизирующего штамм бактерии, не менее чем на 3+, при этом антибиотик берут в двух концентрациях: МПК и 1/2 МПК. В случае устойчивости к фагу бактерий — антибиотик в максимально допустимой концентрации [19].

С использованием автоматизированных систем этот способ позволяет строить синопаммы в режиме реального времени, изучая концентрации антибиотиков и титра бактериофагов. Прибор из каждой лунки считывает величину поглощения как отдельный параметр и преобразует полученные данные в тепловую карту, представляющую процент снижения количества бактерий. Как правило, синопаммы удается разделить на три части: область действия антибиотика, область действия бактериофага и область их совместного действия, по которой возможно оценить эффект их взаимодействия (PAS). Использование этого метода позволяет визуализировать эффективность комбинации и выбрать оптимальную концентрацию антибиотика и фага. Дополнительным преимуществом этого метода является возможность смоделировать ситуа-

цию в организме человека при добавлении в лунки биологических жидкостей [21].

Для упрощения этой методики I. Nikolic и соавт. предложили метод «шахматной доски», который используется для изучения взаимодействия 2 химиопрепаратов [22]. Для более надёжного результата метода реализуют в автоматизированном варианте. Выбор разведения зависит от литической активности фага и МПК антибиотика, поэтому перед постановкой теста эти показатели необходимо определить заранее. В лунки стерильного плоскостонного планшета слева направо вносят разведения антибиотика для создания двукратного серийного убывающего градиента концентрации в диапазоне 8–0,125 от МПК. В лунках по направлению сверху вниз создают двукратный серийный убывающий градиент концентрации фага в том же диапазоне, после чего в планшет вносят суспензию тестируемого микроорганизма. Ингибирующие концентрации антибиотика и фага позволяют рассчитывать значения индекса фракционной ингибирующей концентрации (ФИК) с применением формулы:

$$\Sigma \text{ФИК} = \frac{\text{МПК}_{\text{ас}}}{\text{МПК}_{\text{а}}} + \frac{\text{МПК}_{\text{вс}}}{\text{МПК}_{\text{в}}}$$

где: МПК_{ас} — МПК антибиотика в сочетании с бактериофагом, мкг/мл; МПК_а — МПК антибиотика, мкг/мл; МПК_{вс} — МПК фага в сочетании с антибиотиком; МПК_в — МПК бактериофага, мкг/мл.

Учёт результатов:

- ФИК < 0,5 — синергия (комбинация соединений увеличивает ингибирующую активность одного или обоих соединений);
- ФИК = 0,5–4,0 — отсутствие взаимодействия (комбинация не имеет увеличения МПК из-за аддитивного эффекта обоих соединений);
- ФИК > 4 — антагонизм (комбинация соединений увеличивает МПК) [22, 23].

Разведения в бульоне, хотя их считают более надёжными тестами, более сложны по сравнению с использованием плотных питательных сред. Для их постановки требуются работа с большими объёмами в асептических условиях, предварительное определение МПК и литической активности бактериофага, а также специальное оборудование для постоянного подсчёта количества бактерий через короткие промежутки времени в течение суток. В отсутствие спектрофотометра измерение ОП можно заменить количественным высевом из лунок через сутки инкубации, что делает этот метод менее точным и увеличивает трудозатраты и время выдачи ответа как минимум на сутки [20, 24]. Описанные подходы в нашей стране не стандартизированы, при этом требуют много времени на постановку, что имеет ограничение для определения эффектов PAS — совместного назначения антибиотика и бактериофага в условиях практической лаборатории.

Использование плотных питательных сред

Двухслойный агаровый метод

Впервые эффект PAS по отношению к уропатогенному штамму *E. coli* (UPEC) на плотной питательной среде описали А.М. Comeau и соавт. [25]. Они заметили, что вокруг некоторых дисков с антибиотиками, наложенных на среду, засеянную глубинным способом, тестируемый уропатогенный штамм *E. coli* и бактериофаг, фаговые бляшки были значительно крупнее. Авторами было сделано предположение, что сублетальная доза β -лактамов стимулирует активность фага. В дальнейшем результаты были подтверждены при добавлении антибиотиков в разных концентрациях к смеси *E. coli* и фага, которые все вместе заливались в полужидкий агар: фаг образовывал маленькие бляшки без цефотаксима и крупные бляшки в присутствии антибиотика в концентрации 50 нг/мл. При дальнейшем увеличении концентрации антибиотика он полностью подавлял рост бактерии, и результат действия фага было невозможно изучить из-за сплошного лизиса.

Простота изложенной методики позволила другим исследователям провести схожие эксперименты, используя различные штаммы бактерий, препараты фагов и антибиотиков, комбинируя в агаре фаги с бактериями либо бактерии с антибиотиком, а на поверхность застывшего слоя размещать, соответственно, диски с антибиотиками или капли бактериофагов [26–28].

E-тест

Для определения синергии можно использовать метод градиентной диффузии. Существуют две модификации этой методики. В первом варианте две полоски, пропитанные антибактериальными препаратами, размещают перпендикулярно друг другу на засеянную испытуемой культурой чашку Петри, пересекаясь на уровне МПК для каждого антибиотика. Как и в случае с методом «шахматной доски», интерпретация синергии E-теста основана на расчёте индекса ФИК. Во втором варианте теста полоску с антибиотиком накладывают на засеянную газонем культуру в чашку Петри, через час полоску удаляют, а на её место накладывают полоску, пропитанную фагом. В качестве контроля используют вторую чашку с наложенными полосками с антибиотиком и бактериофагом, которые не соприкасаются друг с другом. Синергия определяется как снижение МПК не менее чем на три 10-кратных разведения, индифферентность — как уменьшение МПК не менее чем на два 10-кратных разведения, антагонизм — как увеличение МПК на три и более 10-кратных разведений [15].

Диско-диффузионный метод

В этом варианте перед постановкой классического диско-диффузионного метода проводят инкубацию в течение суток культуры бактерий (0,5 McF) с бактериофагом (10^8 БОЕ/мл), после чего из неё получают суточную культуру на плотной среде. В качестве контроля используют суточную культуру без предварительной инкубации с фагом. Определение синергии антибиотика и фага этим методом затруднительно, т. к. диаметр задержки роста вокруг диска с антибиотиком изменяется незначительно [29]. Также к недостаткам метода можно отнести двойной расход стандартных дисков за счёт постановки контролей.

Заключение

Как показывает анализ доступных источников, на сегодняшний день отсутствуют доступные и воспроизводимые в рутинной лабораторной практике методики по определению взаимодействия бактериофагов и антибиотиков. При сравнении известных методов не удаётся получить их 100% корреляцию; совпадение варьирует от 44 до 88% при сравнении time-kill assays с методом «шахматной доски», от 63 до 75% — при сравнении time-kill assays с E-тестом и около 90% — при сравнении E-теста с методом «шахматной доски». В большинстве работ предлагается авторский метод без сопоставления с существующими, а в качестве тест-штамма используют один вид и штамм микроорганизма. В то же время взаимодействие фага и антибиотика зависят не только от выбранных препаратов, но и от тестируемого штамма в пределах одного вида. Исследования показали, что даже прогнозы, полученные при помощи искусственного интеллекта и машинного обучения, требуют перепроверки в лаборатории перед началом лечения [15]. И несмотря на то что описаны предполагаемые механизмы синергетического действия фагов с антибиотиками, индуцирующими и не индуцирующими SOS-репарацию⁶, чтобы ответить на вопрос, можно ли комбинировать фаги с антибиотиками для лечения инфекции, вызванной конкретным штаммом, необходимо каждый раз проводить тестирование *in vitro*. Для определения чувствительности бактерий к комбинации антибиотиков и фагов в исследовании необходимо включать все вирулентные бактериофаги даже при исходной нечувствительности к ним бактерий, поскольку описано восстановление чувствительности штамма к фагу в присутствии

⁶ Защитная система бактерий, которая активируется в ответ на повреждение ДНК или ингибирование репликации и запускает сложную цепочку защитных реакций. SOS (save our souls) — международный сигнал бедствия в радиотелеграфной связи с использованием азбуки Морзе.

антибиотика и проявление синергии 2 препаратов. Одно из новых направлений — исследование механизмов совместного действия антибиотиков и умеренных фагов, которые всегда рассматривались как непреодолимое препятствие для терапии. Синергия уже описана у 7 групп антибиотиков с умеренным бактериофагом [30].

Одной из ключевых задач микробиологической лаборатории является предоставление достоверной информации по использованию противомикробных препаратов, в том числе их комбинаций, для лечения инфекционных заболеваний. Методы, с помощью которых лаборатория оценивает чувствительность к антибиотикам и бактериофагам по отдельности, высоко стандартизированы и воспроизводимы. Именно эта воспроизводимость позволяет лабораториям получать сопоставимые результаты. С учётом того, что предсказать эмпирически взаимодействие антибиотика и фага невозможно, а сочетание бактериофагов и антибиотиков способно вызывать как положительные, так и отрицательные сдвиги в изменении МПК химиопрепарата, необходима разработка максимально простой методики с понятным протоколом и доступным оборудованием, которая может быть внедрена в любую микробиологическую лабораторию.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Назаров П.А. Альтернативы антибиотикам: литические ферменты бактериофагов и фаговая терапия. *Вестник Российской государственной медицинской университета*. 2018;(1):5–15. Nazarov P.A. Alternatives to antibiotics: lytic enzymes of bacteriophages and phage therapy. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2018;(1):5–15. DOI: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.002> EDN: <https://elibrary.ru/xxwewl>
2. Kim M., Jo Y., Hwang Y.J., et al. Phage-antibiotic synergy via delayed lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018;84(22):e02085–18. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02085-18>
3. Segall A.M., Roach D.R., Strathdee S.A. Stronger together? Perspectives on phage-antibiotic synergy in clinical applications of phage therapy. *Curr. Opin. Microbiol.* 2019;51:46–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.03.005>
4. Turner P.E., Azeredo J., Buurman E.T., et al. Addressing the research and development gaps in modern phage therapy. *PHAGE*. 2024;5(1):30–9. DOI: <https://doi.org/10.1089/phage.2023.0045>
5. Benyamini P. Beyond antibiotics: what the future holds. *Antibiotics (Basel)*. 2024;13(10):919. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13100919>
6. Xiao G., Li J., Sun Z. The combination of antibiotic and non-antibiotic compounds improves antibiotic efficacy against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(20):15493. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms242015493>
7. Dufour N., Delattre R., Ricard J.D., Debarbieux L. The lysis of pathogenic *Escherichia coli* by bacteriophages releases less endotoxin than by β -lactams. *Clin. Infect. Dis.* 2017;64(11):1582–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix184>
8. Yang Q., Le S., Zhu T., Wu N. Regulations of phage therapy across the world. *Front. Microbiol.* 2023;14:1250848. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1250848>
9. Hitchcock N.M., Devequi Gomes Nunes D., Shiach J., et al. Current clinical landscape and global potential of bacteriophage therapy. *Viruses*. 2023;15(4):1020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15041020>
10. Al-Ishaq R.K., Skariah S., Büsselberg D. Bacteriophage treatment: critical evaluation of its application on World Health Organization priority pathogens. *Viruses*. 2020;13(1):51. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13010051>
11. Sybesma W., Rohde C., Bardy P., et al. Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy — part II. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(2):35. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020035>
12. Nepal R., Houtak G., Shaghayegh G., et al. Prophages encoding human immune evasion cluster genes are enriched in *Staphylococcus aureus* isolated from chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps. *Microb. Genom.* 2021;7(12):000726. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000726>
13. Liu C., Hong Q., Chang R.Y.K., et al. Phage-antibiotic therapy as a promising strategy to combat multidrug-resistant infections and to enhance antimicrobial efficiency. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(5):570. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050570>
14. Qin K., Shi X., Yang K., et al. Phage-antibiotic synergy suppresses resistance emergence of *Klebsiella pneumoniae* by altering the evolutionary fitness. *mBio*. 2024;15(10):e0139324. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.01393-24>
15. Doern C.D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52(12):4124–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01121-14>
16. Knezevic P., Curcin S., Aleksic V., et al. Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.* 2013;164(1):55–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.008>
17. Attwood M., Griffins P., Noel A., et al. Development of antibacterial drug+bacteriophage combination assays. *JAC-Antimicrobial Resistance*. 2024;6(4):dlae104. DOI: <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlae104>
18. Абдраймова Н.К., Корниенко М.А., Беспятых Д.А. и др. Комбинированное воздействие бактериофага vb_saum-515a1 и антибиотиков на клинические изоляты *Staphylococcus aureus*. *Вестник Российской государственной медицинской университета*. 2022;(5):23–30. Abdraimova N.K., Kornienko M.A., Bespyatykh D.A., et al. Combined effect of bacteriophage vb_saum-515a1 and antibiotics on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2022;(5):23–30. DOI: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2022.052>
19. Yerushalmy O., Braunstein R., Alkalay-Oren S., et al. Towards standardization of phage susceptibility testing: The Israeli phage therapy center «Clinical phage microbiology» — a pipeline proposal. *Clin. Infect. Dis.* 2023;77(Suppl. 5):S337–51. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciad514>
20. Alharbi M.G., Al-Hindi R.R., Alotibi I.A., et al. Evaluation of phage-antibiotic combinations in the treatment of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella enteritidis* strain PT1. *Heliyon*. 2023;9(1):e13077. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13077>
21. Gu Liu C., Green S.I., Min L., et al. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *mBio*. 2020;11(4):e01462–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.01462-20>
22. Артюх Т.В. Изучение синергии антибактериальных препаратов с использованием метода «шахматной доски» и анализа «времени уничтожения». *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2022;67(3):332–42. Artyukh T.V. Studying synergy of antibacterial drugs using the “checkerboard” method and the

ОБЗОРЫ

- “time-kill” analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological Series*. 2022;67(3):332–42. DOI: <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-332-342>
23. Nikolic I., Vukovic D., Gavric D., et al. An optimized checkerboard method for phage-antibiotic synergy detection. *Viruses*. 2022;14(7):1542. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14071542>
24. Manohar P., Madurantakam Royam M., Loh B., et al. Synergistic effects of phage-antibiotic combinations against *Citrobacter amalonaticus*. *ACS Infect. Dis.* 2022;8(1):59–65. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00117>
25. Comeau A.M., Tétart F., Trojet S.N., et al. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One*. 2007;2(8):e799. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>
26. Iqbal M., Narulita E., Zahra F., Murdiyah S. Effect of Phage-Antibiotic Synergism (PAS) in increasing antibiotic inhibition of bacteria caused of foodborne diseases. *J. Infect. Dev. Ctries*. 2020;14(5):488–93. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.12094>
27. Ali S., Aslam M.A., Kanwar R., et al. Phage-antibiotic synergism against *Salmonella typhi* isolated from stool samples of typhoid patients. *Ir. J. Med. Sci.* 2024;193(3):1377–84. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11845-023-03599-w>
28. Moradpour Z., Yousefi N., Sadeghi D., Ghasemian A. Synergistic bactericidal activity of a naturally isolated phage and ampicillin against urinary tract infecting *Escherichia coli* O157. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2020;23(2):257–63. DOI: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.37561.8989>
29. Вакарина А.А., Алешкин А.В., Рубальский Е.О. и др. Влияние вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий *Staphylococcus aureus*. *Астраханский медицинский журнал*. 2020;15(4):29–39. Vakarina A.A., Aleshkin A.V., Rubalsky E.O., et al. Effect of virulent bacteriophages on antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* bacteria. *Astrakhan Medical Journal*. 2020;15(4):29–39. DOI: <https://doi.org/10.17021/2020.15.4.29.39> EDN: <https://elibrary.ru/ytmuqt>
30. Al-Anany A.M., Fatima R., Nair G., et al. Temperate phage-antibiotic synergy across antibiotic classes reveals new mechanism for preventing lysogeny. *mBio*. 2024;15(6):e0050424. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00504-24>

Информация об авторах

Пунченко Ольга Евгеньевна[✉] — к. м. н., доцент, доцент кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; с. н. с. лаб. биомедицинской микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, olga.punchenko@szgmu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1847-3231>

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., доцент каф. медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; с. н. с. научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Детского научно-клинического центра инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3480-8089>

Пунченко Елизавета Викторовна — аспирант факультета биотехнологий Университета ИТМО, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0009-0575-9423>

Савченко Марина Владимировна — студентка 6-го курса медико-профилактического факультета СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0002-3407-1635>

Участие авторов: Пунченко О.Е. — идея статьи, общее руководство, написание текста статьи; Гостев В.В. — написание текста статьи, утверждение окончательного варианта статьи; Пунченко Е.В. — написание текста статьи, редактирование текста; Савченко М.В. — написание текста статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию для публикации.

Статья поступила в редакцию 19.08.2024;
принята к публикации 09.09.2024;
опубликована 30.10.2024

Information about the authors

Olga E. Punchenko[✉] — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Medical Microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia; senior researcher, Laboratory of biomedical microecology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, olga.punchenko@szgmu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1847-3231>

Vladimir V. Gostev — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of medical microbiology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia; senior researcher, Research department of medical microbiology and molecular epidemiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3480-8089>

Elizaveta V. Punchenko — postgraduate student, Faculty of biotechnology, ITMO University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0009-0575-9423>

Marina V. Savchenko — 6th year student, Medical and preventive faculty, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint-Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0002-3407-1635>

Author contribution: Punchenko O.E. — idea of the article, general guidance, writing the text of the article; Gostev V.V. — writing the text of the article, approving the final version of the article; Punchenko E.V. — writing the text of the article, editing the text; Savchenko M.V. — writing the text of the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the 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 19.08.2024;
accepted for publication 09.09.2024;
published 30.10.2024

ЮБИЛЕИ

90 лет Ростовскому-на-Дону противочумному институту: история, достижения и перспективы



В 2024 г. Ростовский-на-Дону противочумный институт отмечает 90-летие. Основной задачей с момента основания института и до настоящего времени является борьба с особо опасными и природно-очаговыми инфекционными болезнями, разработка методов диагностики и профилактики, а также обеспечение биологической безопасности и противодействие биотерроризму. Претерпев ряд реорганизаций и сменив несколько названий, институт остается одним из ведущих многофункциональных научно-практических учреждений в стране, деятельность которого заключается не только в проведении научно-исследовательских работ, но и в организации эффективной работы референс-центров по мониторингу холеры и туляремии, центров индикации и секвенирования, ПЦР-центра и испытательного лабораторного центра, специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ).

История института начинается с 1934 г., когда в результате реорганизации Ростовского городского бактериологического института и Ростовской краевой противочумной станции был образован «Азово-Черноморский край. Институт противочумный, г. Ростов-на-Дону», переименованный в 1937 г. в «Ростовский-на-Дону государственный научно-исследовательский противочумный институт Юга РСФСР». Директором института был назначен Михаил Исаевич Любашевский, который организовал планомерную работу по формированию кадрового состава, обеспечению его научной и практиче-

ской деятельности. В годы становления институт состоял из 8 структурных подразделений, в которых работали 24 научных сотрудника и 100 человек технического персонала, в непосредственном подчинении института было 9 противочумных пунктов.

С 1934 по 1940 г. специалистами института было проведено эпизоотологическое обследование природных очагов опасных инфекций Северо-Западного Прикаспия; разработаны и осуществлены широкомасштабные мероприятия по ликвидации эпизоотий чумы и туляремии на территории Азово-Черноморского края и Северного Кавказа; выполнены оригинальные исследования по эпизоотологии, эпидемиологии, патогенезу и иммуногенезу чумы и туляремии. В предвоенные годы в институте работали крупные учёные: Николай Николаевич Жуков-Вережников, Георгий Павлович Руднев, Петр Никитич Ступницкий, Иосиф Самсонович Тинкер. Их вклад в изучение чумы поистине неоценим.

С 1939 по 1964 г. институт возглавлял лауреат Сталинской премии, к. м. н. Александр Кондратьевич Шишкин, несомненной заслугой которого является организация работы института во время Великой Отечественной войны и в послевоенный период. В эти годы количество подразделений увеличилось до 13, в подчинении института находилось уже 30 противочумных лабораторий, отделений и станций. В 1941 г. А.К. Шишкин в труднейших условиях военного времени, сохранив все имущество и основные кадры, провёл эвакуацию института в с. За-



Ростовский-на-Дону государственный научно-исследовательский противочумный институт Юга РСФСР в 1930-е годы.

ЮБИЛЕИ

ветное, города Элисту, Астрахань и Гурьев (сначала в Калмыцкую АССР, а затем в Казахскую ССР). Лишь в апреле 1943 г. коллектив возвратился из эвакуации в освобождённый Ростов-на-Дону, немедленно приступив к восстановлению института и решению основной задачи — окончательной ликвидации эпизоотии чумы в очаге Северо-Западного Прикаспия. За успешное выполнение этой задачи 9 сотрудников института были удостоены Сталинской премии. Масштабную работу проводили по борьбе не только с чумой, но и с туляремией, бруцеллезом, брюшным тифом, дизентерией и холерой. Именно в военные годы (1943 г.) в институте был организован отдел холеры под руководством д. м. н., профессора Марии Семеновны Дрожжевиной, курировала работу отдела д. м. н., профессор, академик Зинаида Виссарионовна Ермольева. За образцовое выполнение заданий военного командования и Наркомздрава СССР сотрудники института были награждены орденами и медалями Советского Союза (в том числе боевыми). В трудные послевоенные годы на старых машинах, а зачастую даже пешком, специалисты института продолжали исследование северо-западного прикаспийского природного очага чумы. Нельзя не отметить вклад в эту работу д. б. н., профессора Николая Прокофьевича Миронова, который, несмотря на то что потерял левую руку в боях, не только принимал активное участие в этих мероприятиях, но и предложил схему конкретных действий по окончательной ликвидации энзоотии чумы в указанном очаге, создал лабораторию биологических методов борьбы с переносчиками и носителями возбудителей особо опасных инфекций.

Внимание исследователей в те годы было сосредоточено и на совершенствовании методов серологической диагностики инфекций. На базе института д. м. н., профессор Моисей Иосифович Леви разработал и внедрил в практику антигенные и иммуноглобулиновые эритроцитарные диагностические тесты, которые используются и в настоящее время.

Мировым достижением является создание и внедрение в практику живой туляремийной вакцины под руководством Бориса Яковлевича Эльберта и Иосифа Самсоновича Тинкера на основе штамма Николая Акимовича Гайского с использованием жидкой желточной среды, разработанной Марией Семеновной Дрожжевиной. Проведённые исследования и введение массовой вакцинации населения существенно снизили заболеваемость туляремией в стране. Советское правительство высоко оценило эту работу и в 1946 г. удостоило звания лауреатов Сталинской премии Б.Я. Эльберта и Н.А. Гайского.

В 1963 г. в институте была создана лаборатория профилактики и лечения чумы, которую более 30 лет возглавляла д. м. н., профессор Любовь Николаевна Макаровская. Под её руководством Нина Кузьминична Завьялова защитила кандидатскую



Памятник З.В. Ермольевой в Ростове-на-Дону.

диссертацию «Опыт лечения чумы», пойдя сознательно на заражение этой болезнью с целью испытания на себе эффективности метода лечения.

Подполковник медицинской службы запаса д. м. н., профессор Григорий Моисеевич Мединский, который имел опыт организации противобактериологической защиты населения и разработки оперативных документов, предложил идею создания СПЭБ (Приказ Минздрава СССР от 30.09.1963 № 466 о формировании СПЭБ на базе противочумных учреждений), занимался проблемами санитарной охраны территорий от завоза и распространения карантинных инфекций. Сотрудники института в составе СПЭБ принимали участие в проведении комплекса противохолерных мероприятий в 1960-е гг. в республиках Средней Азии (Узбекистан, 1965), в локализации и ликвидации вспышек холеры в Астрахани (1970), Одессе (1970), Керчи (1970), Донецке (1971), Вилково Одесской области (1991), Республике Дагестан (1994); в работе по ликвидации последствий землетрясения в Армении (1988); в Чечне в условиях военного конфликта (1995) и др.

Под руководством д. м. н., д. б. н., академика РАМН и РАЕН Игоря Валериановича Домарадского, директора Ростовского-на-Дону противочумного института с 1964 г. по 1973 г., проводились фундаментальные исследования в области биохимии, генетики, молекулярной биологии возбудителей чумы и других особо опасных инфекций; патогенеза, лечения и профилактики инфекционных заболеваний, вызванных микроорганизмами I–II групп патогенности.

В 1970 г. на юге СССР возникла эпидемия холеры, в борьбе с которой сотрудники приняли активное участие. За практические успехи и научные достижения институт в 1971 г. получил статус головного по проблеме «Холера», сохраняющийся до

сих пор. Результаты научных исследований лаборатории микробиологии холеры под руководством эксперта Всемирной организации здравоохранения при ООН (1963–1973 гг.), к. м. н. Ранта Михайловича Саямова легли в основу признания роли вибрионов El Tor в этиологии холеры. Заведующий лабораторией патофизиологии к. м. н. Владимир Павлович Авроров с коллегами разработал, апробировал и внедрил в практику комплексный метод лечения диарейных заболеваний у людей, создав отечественный препарат для оральной регидратационной терапии холеры «Глюкосолан».

С 1973 г. под руководством заслуженного деятеля науки РФ, д. м. н., профессора Виктора Николаевича Милютина получило развитие новое направление по созданию сухих питательных сред для культивирования и диагностики возбудителей особо опасных инфекций и некоторых других патогенных микроорганизмов. Также в эти годы в Ростовском-на-Дону противочумном институте разработаны основы районирования территории страны по степени опасности заноса и распространения холеры. В 1970–1980 гг. д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ Борис Николаевич Мишанькин сформировал направление по изучению биохимии холерных вибрионов: были изучены и охарактеризованы многие ферменты, определены их роль и участие в патогенезе холеры; получены важные приоритетные как теоретические, так и практические данные о биохимическом потенциале холерных вибрионов. В 1982 г. создана лаборатория холерных диагностических фагов, которую более 30 лет возглавляла д. м. н. Татьяна Александровна Кудрякова. На основе совокупности биологических и морфологических признаков, качественной характеристики бактериофагов возбудителей особо опас-

ных инфекций получены доказательства биологического разнообразия этой группы бактериальных вирусов, имеющих не только теоретическое, но и важное практическое значение. Наличие обширной коллекции фагов позволило разработать схему фотипирования холерных вибрионов, признанную Всемирной организацией здравоохранения и используемую на практике.

За заслуги в организации борьбы с особо опасными инфекционными болезнями в 1984 г. Указом Президиума Верховного Совета СССР Ростовский-на-Дону противочумный институт был награжден орденом Трудового Красного Знамени.

С 1986 по 1988 г. институт возглавлял д. м. н., профессор Александр Сергеевич Новохатский, который способствовал внедрению в работу новых технологий и методов исследований: гибридной технологии получения моноклональных антител, полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализ и др.

Успешно реализовал потенциал института как головного методического центра по холере заслуженный деятель науки РФ, д. м. н., профессор Юрий Михайлович Ломов (директор с 1988 по 2010 г.). В этот период интенсифицировались исследования, посвященные экологии холерных вибрионов и их сохранности в окружающей среде. С 2008 г. институт является Референс-центром по мониторингу холеры на территории Российской Федерации, осуществляя мониторинг заболеваемости, формируя прогнозы развития эпидемиологической ситуации, изучая молекулярно-биологические свойства штаммов холерных и других патогенных для человека вибрионов, в том числе с атипичными свойствами.

В XXI в. институт возглавляли к. м. н. Алексей Борисович Мазрухо (директор с 2011 по 2013 г.),



Ростовский-на-Дону противочумный институт в наши дни.

ЮБИЛЕИ

к. м. н. Светлана Викторовна Титова (директор с 2013 по 2019 г.) и к. м. н. Алексей Кимович Носков (директор с 2019 по 2024 г.), который для эффективного решения научных и практических задач, учитывая вызовы современности, оптимизировал структуру института. Алексей Кимович возглавлял исследования по совершенствованию тактики и разработки алгоритмов обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия на территории субъекта Российской Федерации, в том числе в условиях экстраординарного события на территории сопредельного государства и в условиях пандемического распространения болезней; активно внедрял в работу института высокопроизводительное секвенирование и переход к геномному эпидемиологическому надзору. Благодаря взаимодействию с учреждениями Роспотребнадзора в Ростовской области расширился спектр изучаемых традиционных инфекций за счёт болезней краевой инфекционной патологии — Крымской геморрагической лихорадки, клещевого боррелиоза, лихорадки Западного Нила и др. В рамках осуществления мероприятий по укреплению международной сети по противодействию чрезвычайным ситуациям санитарно-эпидемиологического характера 7 декабря 2021 г. прошла передача мобильного комплекса СПЭБ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора Министерству здравоохранения и социального развития Киргизской Республики. Под руководством Алексея Кимовича специалисты СПЭБ участвовали в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в зонах чрезвычайных ситуаций, различных по характеру (г. Симферополь, 2021; г. Форос, 2021; г. Мариуполь, с 2022 по настоящее время; г. Геническ, 2023; г. Рассказово, 2023), в местах проведения массовых мероприятий (г. Сочи, 2024). Кроме того, была проведена работа в рамках международного сотрудничества (Республика Конго, 2023; Боливарианская Республика Венесуэла, 2023).

В 2024 г. на базе института создан Референс-центр по мониторингу туляремии, функции которого заключаются в оказании консультативно-методической и практической помощи органам и учреждениям Роспотребнадзора и медицинским организациям субъектов Российской Федерации по вопросам эпидемиологии, эпизоотологии, профилактики и диагностики туляремии. Референс-центр проводит анализ эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по туляремии и углублённое изучение культур возбудителя туляремии с исполь-

зованием традиционных и современных методов анализа. На основе результатов расширенной идентификации составляется геномный портрет штаммов туляремийного микроба. Проводится работа по созданию электронной базы данных и геоинформационной системы природных очагов туляремии на территории Российской Федерации. В институте существует пополняемая коллекция штаммов *Francisella tularensis*, паспортные данные которых содержат характеристики фенотипических и молекулярно-биологических свойств.

С момента основания института на его базе постоянно идёт подготовка кадров по различным аспектам особо опасных инфекций. Взаимодействие с учреждениями Роспотребнадзора и Минздрава происходит не только при обучении специалистов, но и в процессе выполнения общих научных и практических задач. Важным моментом является и сотрудничество с Ростовским государственным медицинским университетом, Южным федеральным университетом, Ростовским базовым медицинским колледжем и другими образовательными учреждениями Ростовской области, что обеспечивает взаимодействие с подрастающим поколением.

Весомые результаты 90-летней масштабной и разноплановой научной деятельности института отражены в тысячах опубликованных научных работ. В ходе выполнения научных тем сотрудниками института предложены новые и усовершенствованы методы лабораторной диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней. Созданы диагностические препараты, базы данных и геоинформационные системы, разработаны методические документы федерального и регионального уровней, защищено более 50 докторских и 250 кандидатских диссертаций. На базе института подготовлены тысячи специалистов, составивших гордость отечественной науки и практического здравоохранения.

В настоящее время под руководством Натальи Евгеньевны Гаевской специалисты Ростовского-на-Дону противочумного института, основываясь на огромном опыте предшественников и современных знаниях, продолжают традиционные научные направления исследований.

Редакционная коллегия и редакция «Журнала эпидемиологии, микробиологии и иммунобиологии» поздравляет коллектив Ростовского-на-Дону противочумного института с юбилеем института и желает успехов в исследовательской и практической работе!

ХРОНИКА



РЕЗОЛЮЦИЯ

V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 10–11 октября 2024 года)

10–11 октября 2024 г. в Москве состоялась V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы».

Мероприятие инициировано Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и организовано Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии Роспотребнадзора при содействии Российской академии наук, Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов и Национальной ассоциации специалистов по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского.

Приветственное слово главы Роспотребнадзора А.Ю. Поповой участникам конференции представил директор Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора академик РАН В.Г. Акимкин. «Руководством страны поставлена стратегическая задача сохранения здоровья нации, снижения уровня смертности, преодоления демографического спада в стране, — говорится в приветствии. — Вакцинопрофилактика — наиболее эффективное и экономически рентабельное профилактическое мероприятие по сохранению здоровья населения и обеспечению активного долголетия, известное в современной медицине. Это один из главных инструментов по противодействию новым и уже известным биологическим угрозам».

Поздравления по поводу открытия конференции и пожелания плодотворной работы переданы слушателям член президиума РАН, академик-секретарь отделения медицинских наук РАН В.И. Стародубов.

Приветственная часть завершилась награждением: золотая медаль имени В.И. Покровского за вклад в борьбу с инфекциями была вручена директору Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора акаде-

мику РАН В.Г. Акимкину. Его программный доклад, посвященный вопросам унификации и совершенствования системы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, открыл пленарное заседание.

В своем выступлении В.Г. Акимкин отметил, что необходимость оптимизации продиктована рядом факторов: ростом числа нозологий, подлежащих эпиднадзору, внедрением информационных технологий эпидемиологической диагностики, правовыми и организационными аспектами. Сегодня появляются всё новые инфекционные болезни, и важнейшим научным направлением в эпиднадзоре становится молекулярно-генетический мониторинг патогенов. «Это достояние последнего десятилетия», — сказал В.Г. Акимкин, отметив, что Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора разработал и ввёл в действие платформу VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia) — один из важнейших инструментов для обеспечения эпидблагополучия и биобезопасности в период пандемии. В национальную базу данных загружаются не только сведения о SARS-CoV-2, в настоящее время она содержит информацию уже о 47 патогенах, а к 2025–2026 гг. их число планируется расширить до 150. «Сегодня мы находимся на новом витке понимания эпиднадзора, — подчеркнул директор НИИ Эпидемиологии. — Молекулярно-генетические исследования позволят распространить опыт эпиднадзора и на другие инфекционные болезни, унифицировать его, в том числе для неинфекционных болезней, а также разработать универсальные средства и методы контроля за эпидемическим процессом».

За последние годы России удалось достичь существенного снижения заболеваемости инфекциями, управляемыми средствами вакцинопрофилактики, и обеспечить население защитой. Сегодня в мире разработано более 100 различных вакцинных препаратов, которыми контролируются около 46 заболеваний. Специфическая вакцинопрофилактика инфекционных болезней в ряде случаев при-

ХРОНИКА

водит к снижению не только заболеваемости, но и смертности от заболеваний, имеющих неинфекционную природу.

Представляя «целую армию детских врачей», главный внештатный детский специалист по профилактической медицине Минздрава России академик РАН Л.С. Намазова-Баранова отметила важность ответственного отношения к своему здоровью, что невозможно без приверженности иммунизации.

Достижения отечественной науки в области разработки генно-инженерных вакцин против возбудителей особо опасных инфекций представил в своем докладе директор Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора академик РАН И.А. Дятлов.

На пленарном заседании также прозвучали доклады академика РАН В.В. Зверева, академика РАН Ю.В. Лобзина, академика РАН Н.И. Брико, профессора И.В. Фельдблюм.

В работе конференции приняли участие ведущие учёные научных учреждений, медицинские специалисты различного профиля, организаторы здравоохранения — всего в онлайн- и офлайн-формате более 2000 человек из 72 регионов Российской Федерации и 9 стран мира.

В рамках научной программы участники обсудили вопросы разработки эффективных средств и схем вакцинопрофилактики, совершенствования национального календаря профилактических прививок, подготовки высококвалифицированных кадров. Всего заслушано 104 доклада.

Сегодня иммунопрофилактика приобретает особое значение не только как единственная эффективная и перспективная технология борьбы с инфекциями, но и как неотъемлемый компонент системы здравоохранения, непрерывная работа которого обеспечивает эпидемиологическое благополучие по целому ряду инфекционных болезней. Выступления на конференции признанных экспертов в сфере иммунопрофилактики и эпидемиологии и научные дискуссии помогут в эффективной реализации конкретных направлений в этой отрасли здравоохранения, а также послужат обогащению участников современными знаниями, укрепят научные и деловые связи специалистов.

Участники V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы», обсудив широкий круг вопросов, связанных с текущим статусом системы иммунопрофилактики в Российской Федерации, решили:

1. Признать необходимость реализации в указанные сроки Плана мероприятий во исполнение «Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года», утверждённой 18 сентября 2020 г. Распоряжением Правительства

Российской Федерации № 2390, для совершенствования защиты от инфекционных заболеваний населения Российской Федерации, гарантированного обеспечения доступности для всех граждан страны качественной иммунизации самыми современными и эффективными вакцинами.

2. Ключевым направлением развития системы иммунопрофилактики считать совершенствование национального календаря профилактических прививок путём расширения перечня инфекций, против которых проводятся плановые прививки. Обеспечить внедрение прививок против менингококковой и ротавирусной инфекций в национальный календарь профилактических прививок в 2025 г.

3. Проанализировать и обобщить опыт субъектов Российской Федерации по созданию региональных программ, которые служат пилотными проектами для апробации подходов для расширения национального календаря профилактических прививок, на постоянной основе осуществлять оценку их эффективности, в том числе экономической.

4. В условиях санкционных мер в отношении поставок зарубежных иммунобиологических препаратов необходимо увеличить мощности отечественных предприятий, выпускающих вакцины, входящие в национальный календарь профилактических прививок, и обеспечивать современным оборудованием и кадрами научно-исследовательские центры, занимающиеся разработкой и испытаниями вакцин.

5. В соответствии со «Стратегией развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года» необходима государственная поддержка российских производственных предприятий по выпуску иммунобиологических препаратов, организации в Российской Федерации полного цикла производства поливалентных пневмококковой, менингококковой конъюгированных вакцин, ротавирусной и папилломавирусной вакцин, вакцины против вируса *Varicella zoster*, комбинированных пяти- и шестикомпонентных вакцин с бесклеточным коклюшным, Hib-компонентом и инактивированной вакциной против полиомиелита.

6. Применить отработанные на примере вакциноуправляемых инфекций и имеющие унифицированный характер методологические подходы к осуществлению эпидемиологического надзора и управления эпидемическими рисками на другие инфекционные и массовые неинфекционные болезни.

7. Повысить оперативность, чувствительность и специфичность эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми инфекциями, а также за побочными проявлениями после иммунизации путём применения современных молекулярно-биологических, в том числе молекулярно-генетических, технологий.

8. В рамках импортозамещения требуется разрабатывать и совершенствовать отечественные

иммуноферментные тест-системы для серодиагностики и серомониторинга вакциноуправляемых инфекций.

9. Необходимо развивать исследования проблемы восприимчивости и резистентности с применением метагеномной методологии, которые знаменуют переход к персонализированной иммунопрофилактике и иммунотерапии.

10. В условиях поэтапного перехода медицинских организаций к оказанию медицинской помощи на основе клинических рекомендаций следует развивать практику разработки и внедрения федеральных клинических рекомендаций по иммунопрофилактике отдельных инфекционных болезней, включая принципы «догоняющей» и сочетанной иммунизации, а также формирования индивидуального графика вакцинации. Организовать разработку клинических рекомендаций по вакцинопрофилактике опоясывающего лишая.

11. Учитывая высокую социально-экономическую значимость гриппа, необходима реализация современных коммуникационных стратегий для обеспечения 75% охвата иммунизацией.

12. Обострение эпидемической ситуации по кори в Российской Федерации требует активизации комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий в соответствии с утверждённой Роспотребнадзором и Минздравом России программой «Элиминация кори и краснухи, достижения спорадической заболеваемости эпидемическим паротитом в Российской Федерации (2021–2025 гг.)» и национальным планом по её реализации. Следует считать выполнение программы элиминации кори и краснухи на пространстве Содружества Независимых Государств одной из приоритетных задач сотрудничества государств-участников. Необходимо обеспечить бесперебойные поставки уже разработанных и сертифицированных отечественных вакцин в достаточном

количестве в первичное звено, сохранить высокие темпы работы по плановой иммунизации населения против кори, активному выявлению и иммунизации лиц, не привитых против этой инфекции, в том числе среди иностранных граждан, а также усилению информационной работы с населением по пропаганде вакцинопрофилактики. Предлагается рассмотреть вопрос о формировании независимой экспертизы качества отечественных вакцин.

13. В условиях роста заболеваемости коклюшем оптимальной стратегией по предотвращению социальных и экономических потерь от этой инфекции является обеспечение своевременного охвата вакцинацией детей первых двух лет жизни в сроки, определённые национальным календарём профилактических прививок (приказ Минздрава России от 06.12.2021 № 1122), поэтапного внедрения возрастных ревакцинаций против коклюша детей, подростков и взрослых — каждые 10 лет с момента последней ревакцинации, а также догоняющей иммунизации лиц, не привитых своевременно. С целью профилактики летальных исходов коклюша у детей первых месяцев жизни следует использовать возможность создания у новорождённого пассивного иммунитета путём иммунизации беременных женщин.

14. Одним из приоритетных направлений в развитии иммунопрофилактики считать улучшение профессиональной подготовки медицинских работников всех специальностей по вопросам вакцинопрофилактики с использованием современных обучающих технологий, в том числе направленных на формирование навыков коммуникации для стимулирования спроса на иммунизацию.

15. В рамках эпидемиологического надзора за иммунопрофилактикой проводить на регулярной основе анализ приверженности вакцинопрофилактике медицинских работников и различных групп населения.