1
ЯНВАРЬ–ФЕВРАЛЬ
Том 102
2025

ЖМЭИ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ и ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY

1
JANUARY–FEBRUARY
Volume 102
2025

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 К1 как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

1

ЯНВАРЬ – ФЕВРАЛЬ

ТОМ 102

2025

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://npoemp.ru

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.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 29.02.2025.
Формат 60×90 1/8. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

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

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2025

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., акад. 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

Ответственный секретарь

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Российские члены редакционной коллегии

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

Брико Н.И., д.м.н., проф., акад. 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., акад. РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

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

Горелов А.В., д.м.н., проф., акад. 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

Исакова-Сивак И.Н., д. б. н., член-корр. РАН, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Караулов А.В., д.м.н., проф., акад. 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., акад. РАН, Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

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

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

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

Логунов Д.Ю., д.б.н., акад. РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, 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., акад. 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., акад. 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., акад. 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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Есьман Анна Сергеевна, к. м. н., Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Россия

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

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

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

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.

1

JANUARY – FEBRUARY

VOLUME 102

2025

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@pcr.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 February 29, 2025.

Print format 60×90 1/8.

Circulation 158 copies.

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

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

© Central Research Institute for Epidemiology, 2025

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 Secretary

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

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

Vasiliy 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

Irina N. Isakova-Sivak, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Biology), Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 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. Kutyrev, 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

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

Denis Yu. Logunov, RAS Full Member, D. Sci. (Biology), N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, D. Sci. (Medicine), Martsinovsky 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

Foreign members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

Bogdan N. Petrunov, MD, D. Sci. (Medicine), Professor, Academician of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

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

Murad Giyas oglu Mammadov, MD, D. Sci. (Medicine), Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

EDITORIAL COUNCIL

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

Inna S. Esman, Cand. Sci. (Medicine), Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Elena R. Meskina, D. Sci. (Medicine), M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

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

НАУКА И ПРАКТИКА

Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И., Притворова Л.Н., Доценко В.В., Зверев В.В., Свитич О.А.
Получение конъюгатов на основе наночастиц коллоидного золота для быстрого выявления антител к вирусу гепатита Е* 7

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зрелкин Д.И., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.
Исследование протективных свойств иммунодоминантных белков ортопоксвирусов при различных способах иммунизации* 18

Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.
Адаптация вирусов гриппа H2N2 с различной рецепторной специфичностью к клеткам MDCK: возможности для разработки культуральной пандемической вакцины против гриппа H2N2* 31

Мескина Е.Р., Хадисова М.К., Ушакова А.Ю., Целипанова Е.Е., Галкина Л.А.
Распространённость, спектр и взаимосвязи краткосрочных и долгосрочных последствий COVID-19 у детей* 44

Устюжанин А.В., Маханёк А.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И.
Сравнительный геномный анализ клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса в неонатальном периоде* 62

Пашинина О.А., Пашкова Т.М., Сычева М.В., Попова Л.П., Карташова О.Л.
Влияние штамма *Enterococcus faecium* 18 на грибы рода *Candida* 72

Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Клюева С.Н., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А.
Интенсивность дегрануляции и лизиса гранулоцитов крови человека при взаимодействии с *Yersinia pestis* на модели бактериемии *ex vivo** 80

Котова В.О., Базыкина Е.А., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е., Кузнецова А.В.
Заболеваемость хроническими вирусными гепатитами и анализ генетического разнообразия вирусов гепатитов В и С среди населения Хабаровска* 91

Беднарская Е.В., Дмитренко Н.Б., Беркович Н.А., Проскурнин Р.В.
Очаги иерсиниозов Крымского полуострова 102

ОБЗОРЫ

Павленко А.В., Сонец И.В., Манолов А.И., Старикова Е.В., Ильина Е.Н.
Резистотипы как характеристика сообществ микроорганизмов, ассоциированных со здоровьем человека. Систематический обзор* 112

ЮБИЛЕИ

50 лет инноваций в борьбе с вирусами: Центр «Вектор» Роспотребнадзора отметил полувековой юбилей 127

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

CONTENTS

SCIENCE AND PRACTICE

Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Amiantova I.I., Pritvorova L.N., Dotsenko V.V., Zverev V.V., Svitich O.A.
Preparation of conjugates based on colloidal gold nanoparticles for application in rapid detection of antibodies to hepatitis E virus* 7

ORIGINAL RESEARCHES

Zrelkin D.I., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Chugunova A.S., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L.
Study of the protective properties of immunodominant proteins of orthopoxviruses in various methods of immunization* 18

Matyushenko V.A., Kostromitina A.D., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N.
Adaptation of H2N2 influenza viruses with different receptor specificity to MDCK cells: opportunities for the development of a cell-based vaccine against pandemic H2N2 influenza* 31

Meskina E.R., Khadisova M.K., Ushakova A.Yu., Tselipanova E.E., Galkina L.A.
Prevalence, spectrum, and the relations between short-term and long-term post-acute sequelae of COVID-19 in children* 43

Ustyuzhanin A.V., Makhanyok A.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I.
Comparative genomic analysis of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborns with different outcomes of the infectious process in the neonatal period* 62

Pashinina O.A., Pashkova T.M., Sycheva M.V., Popova L.P., Kartashova O.L.
Effect of *Enterococcus faecium* strain 18 on fungi of the genus *Candida* 72

Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Shmelkova T.P., Kozhevnikov V.A.
Human blood granulocyte degranulation and lysis intensity during interaction with *Yersinia pestis* in the *ex vivo* model of bacteriemia* 80

Kotova V.O., Bazykina E.A., Balakhontseva L.A., Trotsenko O.E., Kuznetsova A.V.
The incidence of chronic viral hepatitis and the analysis of the genetic diversity of hepatitis B and C viruses among the population of Khabarovsk city* 91

Bednarskaya E.V., Dmitrencko N.B., Berkovich N.A., Proskurnin R.V.
Foci of yersiniosis infections in the Crimean Peninsula 102

REVIEWS

Pavlenko A.V., Sonets I.V., Manolov A.I., Starikova E.V., Ilina E.N.
Resistotypes as a characterization of microbial communities associated with human health. Systematic review* 112

ANNIVERSARIES

50 years of innovation in the fight against viruses: The Vector Center of Rospotrebnadzor celebrated its half-century anniversary 127

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

НАУКА И ПРАКТИКА

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

Получение конъюгатов на основе наночастиц коллоидного золота для быстрого выявления антител к вирусу гепатита Е

Алаторцева Г.И.✉, Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И., Притворова Л.Н., Доценко В.В., Зверев В.В., Свитич О.А.

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

Аннотация

Актуальность. Вирус гепатита Е (ВГЕ) — частая причина вирусных гепатитов не только на территориях с низким уровнем водоснабжения и гигиены, но и в промышленно развитых странах. Важнейшей проблемой совершенствования системы диагностики гепатита Е остаётся разработка тестов быстрого определения серомаркеров инфекции для применения в условиях отсутствия специального оборудования и обученного персонала.

Цель работы — получение конъюгатов наночастиц коллоидного золота (НЧЗ) нескольких размеров с рекомбинантным антигеном ORF2 ВГЕ 3-го генотипа и оценка возможности их применения в иммуноанализе для выявления антител к ВГЕ.

Материалы и методы. Исследовали специфические поликлональные и моноклональные антитела, рекомбинантный антиген ORF2 ВГЕ 3-го генотипа, образцы сывороток крови людей с диагнозом острого гепатита. Осуществляли синтез НЧЗ и их конъюгатов с рекомбинантным антигеном, иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ, иммунохроматографический анализ, использовали метод просвечивающей электронной микроскопии.

Результаты. Цитратным методом с использованием различных концентраций восстановителя синтезированы 3 препарата НЧЗ. На их основе получены конъюгаты с рекомбинантным антигеном ORF2 ВГЕ 3-го генотипа, иммунореактивность которых подтверждена методом дот-иммуноанализа с образцами сывороток крови, содержащими специфические иммуноглобулины класса G (IgG). Для применения в иммунохроматографическом анализе отобран конъюгат на основе НЧЗ диаметром 41 нм. Отработаны условия получения мультимембранного композита, включая формирование аналитической и контрольной линий и зоны конъюгата, изготовлены тест-полоски и проведены испытания полученного конъюгата методом иммунохроматографического анализа с образцами сывороток крови, предварительно охарактеризованными по содержанию IgG-антител к ВГЕ. Показана высокая иммунореактивность полученного конъюгата: антитела к вирусу выявлены в 100% обследованных IgG-положительных проб сывороток (n = 17) и не обнаружены в отрицательных пробах (n = 17).

Выводы. Получены иммунореагенты (рекомбинантный антиген, антитела, конъюгат), которые могут быть использованы при создании тест-систем для экспресс-диагностики ВГЕ.

Ключевые слова: *иммунохроматографический анализ, наночастицы коллоидного золота, рекомбинантный антиген, вирус гепатита Е, белок ORF2, иммуноглобулины класса G*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. 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 Локальным советом по этике НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 4 от 22.02.2023).

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091). Авторы благодарят Олега Лебедева (Laboratoire CRISMAT, ENSICAEN-CNRS UMR6508, Caen, France) за помощь в изучении структуры НЧЗ методом трансмиссионной электронной микроскопии, Национальный институт общественного здоровья МЗ КР и Белорусский государственный медицинский университет за предоставление образцов сывороток крови, содержащих и не содержащих серомаркеры инфицирования вирусом гепатита Е.

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: Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И., Притворова Л.Н., Доценко В.В., Зверев В.В., Свитич О.А. Получение конъюгатов на основе наночастиц коллоидного золота для быстрого выявления антител к вирусу гепатита Е. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):7–17.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620
EDN: https://www.elibrary.ru/ppmxde

© Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И., Притворова Л.Н., Доценко В.В., Зверев В.В., Свитич О.А., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

Preparation of conjugates based on colloidal gold nanoparticles for application in rapid detection of antibodies to hepatitis E virus

Galina I. Alatortseva✉, Lyubov N. Nesterenko, Irina I. Amiantova, Lyudmila N. Pritvorova, Vera V. Dotsenko, Vitaly V. Zverev, Oksana A. Svitich

I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. Hepatitis E virus (HEV) is a common cause of viral hepatitis not only in areas with low levels of water supply and hygiene, but also in industrialized countries. Rapid tests development for the infection seromarkers detection in the absence of special equipment and trained staff remains the most important problem in improving the diagnosis of hepatitis E.

Aim. To produce conjugates of recombinant ORF2 antigen of HEV genotype 3 with gold nanoparticles (GNP) of varied sizes and to evaluate their applicability in the immunoassay for the detection of antibodies to HEV.

Materials and methods. Specific polyclonal and monoclonal antibodies, recombinant antigen ORF2 of hepatitis E virus genotype 3, blood serum samples of people diagnosed with acute hepatitis. Synthesis of GNPs and their conjugates with recombinant antigen, enzyme immunoassay, dot immunoassay, immunochromatographic analysis, transmission electron microscopy.

Results. Three samples of colloidal GNP were synthesized using citrate method with varied concentrations of reducing agent and were subsequently used for preparation of conjugates with recombinant antigen ORF2 of HEV genotype 3. Immunoreactivity of these conjugates was confirmed by dot-immunoassay with blood serum samples containing specific IgG. A conjugate based on a 41 nm GNP was chosen for use in immunochromatographic analysis (ICA). Optimal conditions for preparation of a multi-membrane composite, including formation of analytical and control lines and the conjugate area were identified, and test strips were developed. The obtained conjugate was tested by ICA using blood serum samples which had been subjected to preliminarily characterization by the content of the IgG antibody to HEV. High immunoreactivity of the conjugate was demonstrated. Antibodies to the virus were identified in 100% of the examined (n = 17) IgG-positive serum samples, while in negative samples (n = 17) they were absent.

Conclusion. The results demonstrated effectiveness of the obtained immunoreagents (recombinant antigen, antibodies, conjugate) for use in test-systems for rapid diagnosis of hepatitis E.

Keywords: *immunochromatographic assay, colloidal gold nanoparticles, recombinant antigen, hepatitis E virus, protein ORF2, IgG*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera (protocol No. 4, February 22, 2023).

Acknowledgement. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (unique project identifier RFMEFI61319X0091). The authors thank Oleg Lebedev (Laboratoire CRISMAT, ENSICAEN-CNRS UMR6508, Caen, France) for his help in the HEV structure studying using transmission electron microscopy, the National Institute of Public Health of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic and the Belarusian State Medical University for providing blood sera samples containing and not containing serological markers of HEV infection.

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: Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Amiantova I.I., Pritvorova L.N., Dotsenko V.V., Zverev V.V., Svitich O.A. Preparation of conjugates based on colloidal gold nanoparticles for application in rapid detection of antibodies to hepatitis E virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):7–17.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620
EDN: https://www.elibrary.ru/ppmxde

Введение

Вирус гепатита Е (ВГЕ) — частая причина вирусных гепатитов не только на территориях с низким уровнем водоснабжения и гигиены, но и в промышленно развитых странах [1]. Европейская ассоциация по изучению печени рекомендует следующие критерии для клинической диагностики случаев острого гепатита Е (ГЕ): одновременное присутствие в анализируемых пробах РНК ВГЕ и специфических IgM- и/или IgG-антител (IgM-АТ,

© Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Amiantova I.I., Pritvorova L.N., Dotsenko V.V., Zverev V.V., Svitich O.A., 2025

IgG-АТ), повышение титров IgG-АТ на фоне присутствия IgM-АТ, выявление антигена (АГ) ВГЕ. Диагноз хронического ГЕ подтверждается обнаружением РНК ВГЕ и/или АГ-ВГЕ в течение более 3 мес. О перенесённой инфекции судят по присутствию в образцах специфических IgG [2]. Золотым стандартом диагностики острых и хронических случаев ГЕ остаётся полимеразная цепная реакция, позволяющая определять вирусную РНК на самых ранних стадиях заболевания и при отсутствии специфических антител у пациентов с иммунодефицитом при хроническом ГЕ. В ряде случаев более надёжными и специфичными являются серологические методы диагностики ГЕ [3], которые из-за короткого периода вирусемии при ГЕ в большинстве случаев не имеют альтернативы [4]. У каждого традиционно применяемого метода серодиагностики ГЕ есть ограничения, затрудняющие точное определение стадии заболевания. Из-за трудностей, связанных с культивированием вируса, в тест-системах для диагностики ГЕ используют в основном рекомбинантные АГ, реже — синтетические пептиды.

Проблему ускоренного получения результатов предварительной лабораторной диагностики ГЕ решает использование экспресс-тестов для выявления специфических IgG-, IgM-, суммарных АТ и АГ-ВГЕ. Как правило, такие тесты основаны на методе иммунохроматографического анализа (ИХА) с применением коллоидного золота, конъюгированного с рекомбинантными АГ или АТ к вирусным белкам и/или иммуноглобулинам человека или животных. Наряду с ускоренным проведением анализа (15 мин), большим преимуществом метода является возможность тестирования у постели больного в отсутствие специального оборудования и обученного персонала. Разработанные и выпускаемые зарубежными компаниями тест-системы в формате ИХА для выявления АГ-ВГЕ и АТ к нему показали хорошую воспроизводимость при достаточно высоких показателях чувствительности, специфичности и хорошей согласованности результатов с данными, полученными с помощью классического иммуноферментного анализа (ИФА). Ряд сравнительных испытаний показал, что ИХА-тесты для выявления IgM-АТ к ВГЕ, производимые в Китае («IgM antibody to hepatitis E virus (HEV-IgM) rapid test», «Wantai», кат № WJ-15) и Сингапуре («MP Diagnostics ASSURE HEV IgM Rapid Test», «MP Biomedicals Asia Pacific Pte. Ltd.», кат. № 43160-020), обладают даже более высокой чувствительностью, чем некоторые традиционные ИФА-тесты [5]. Канадские компании «Citest Diagnostics Inc.» и «BiogateLabs» выпускают иммунохроматографические тест-системы для одновременного определения IgG- и IgM-АТ к ВГЕ (кат № IHE-302, кат № RT-EV1112-C-1 соответственно) в сыворотке, плазме и цельной крови. В России и странах постсоветского пространства тест-системы для быстрого выявления серологических маркеров ГЕ методом ИХА не производятся, нет также сообщений о проводимых в этом направлении исследованиях.

Ключевыми компонентами диагностических экспресс-тестов, предназначенных для выявления серологических или биохимических маркеров различных заболеваний, наряду со специфическими АГ или АТ, являются конъюгаты коллоидных наночастиц с биологическими макромолекулами, применение которых позволяет проводить визуальный или цифровой учёт результатов реакции [6–9]. Известно, что уникальные оптические свойства наночастиц золота (НЧЗ) обусловлены явлением поверхностного плазмонного резонанса, что проявляется интенсивной полосой поглощения в видимой области спектра. Пики поглощения поверхностных плазмонов наблюдаются у синтезированных НЧЗ в области длин волн около 520 нм в зависимости от размера синтезированных НЧЗ [10]. К преимуществам применения конъюгатов на основе НЧЗ в методах экспресс-диагностики можно отнести возможность визуальной детекции результатов, что связано с высокими молярными коэффициентами поглощения [9, 11], а также их способность к полному восстановлению свойств после сорбции на мембране и последующего её высушивания [12, 13]. Диагностическая эффективность ИХА-тестов определяется способностью конъюгата НЧЗ специфически взаимодействовать с молекулами-мишенями, которая, с одной стороны, связана с физико-химическими свойствами НЧЗ, в частности, с их размером и формой, а с другой — с антигенной специфичностью сорбированных на них белков, выполняющих дополнительную функцию вторичной стабилизации коллоидных частиц в составе конъюгатов.

Все тест-системы для выявления АТ к ВГЕ основаны на применении в качестве антигенной основы капсидного белка ORF2, содержащего диагностически значимые эпитопы. Ранее нами был получен [14] рекомбинантный АГ (рекАГ) ORF2 ВГЕ 3-го генотипа, имеющего наиболее широкое географическое распространение в мире [15, 16] и доминирующего на территории России [17]. Данный рекАГ выбран нами в качестве основы для последующей разработки экспресс-теста для одновременного определения антител IgG и IgM к ВГЕ.

Цель данного исследования — получение конъюгатов НЧЗ нескольких размеров с рекАГ и оценка возможности их применения в иммуноанализе для выявления IgG-антител к ВГЕ.

Материалы и методы

Иммунореагенты

Использовали поликлональные АТ козы против IgG человека (GAHIss; «Имтек»), рекАГ ORF2 ВГЕ

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

3-го генотипа (НИИВС им. И.И. Мечникова) [18], поликлональные IgG-АТ кролика к рекАГ, полученные путём иммунизации кроликов и последующей аффинной очистки (НИИВС им. И.И. Мечникова); конъюгат моноклональных АТ мыши к рекАГ с пероксидазой хрена (НИИВС им. И.И. Мечникова), полученный методом перйодатного окисления [19].

Сыворотки крови людей с диагнозом острого вирусного ГЕ были предоставлены Национальным институтом общественного здоровья Министерства здравоохранения Киргизской Республики и Белорусским государственным медицинским университетом. По результатам тестирования в наборе реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы») [20, 21] и разработанном в НИИВС им. И.И. Мечникова подтверждающем тесте для определения IgG-АТ к ВГЕ методом лайн-блота [22] сыворотки содержали (n = 17) и не содержали (n = 17) IgG-АТ к ВГЕ.

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. 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 Локальным советом по этике НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 4 от 22.02.2023).

Растворы наночастиц золота

НЧЗ с заданным размером частиц получали цитратным методом, используя в качестве прекурсора золотохлороводородную кислоту $HAuCl_4 \times 3H_2O$ («Aldrich») [11–13]. Учитывая, что средний диаметр частиц уменьшается при увеличении концентрации цитрата в реакционной смеси [12], для получения препаратов НЧЗ с разными размерами частиц использовали различные количества восстановителя. К 99 мл деионизированной воды добавляли 1 мл 1% раствора $HAuCl_4 \times 3H_2O$, раствор при перемешивании нагревали до кипения, после чего добавляли различные объёмы 1% водного раствора цитрата натрия $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ («Merck»).

Раствор кипятили с обратным холодильником 20 мин при перемешивании, затем охлаждали до комнатной температуры и измеряли спектры поглощения в диапазоне длин волн 400–700 нм с помощью планшетного спектрофотометра «Multiskan GO» («Thermo Scientific»). Структуру НЧЗ исследовали на растровом просвечивающем электронном микроскопе «JEOL JEM ARM200F» атомного разрешения (HAADF-STEM), оснащённом системой энергодисперсионного анализа на основе спектрометра «GIF Quantum» с детектором «CENTURIO EDX» разрешающей способности 0,08 нм при ускоряющем напряжении 200 кВ в STEM-режиме («Jeol») [23, 24]. Препараты для исследования готовили путём нанесения образца, предварительно разбавленного до поглощения 1,0 опт. ед. при длине волны 520 нм, на покрытые плёнкой углерода медные сетки.

Синтез конъюгатов

Оптимальные условия получения конъюгатов НЧЗ с рекАГ подбирали в соответствии с рекомендациями [25, 26]. В лунки 1–11 вертикальных рядов 96-луночного полистиролового планшета («Greiner») вносили по 10 мкл раствора рекАГ с концентрацией 1–50 мкг/мл в фосфатном буфере. Затем в лунки А–Н горизонтальных рядов планшета вносили по 100 мкл растворов НЧЗ с pH 5,5–9,0 таким образом, чтобы каждый столбец соответствовал определённой концентрации рекАГ, а каждый ряд — значению pH раствора. Через 15 мин во все лунки добавляли по 20 мкл 10% раствора NaCl и спустя 10 мин измеряли оптическое поглощение растворов при длинах волн 520 и 580 нм (A_{520}, A_{580}). Стабилизирующую концентрацию рекАГ оценивали по разности «$A_{520} - A_{580}$» [25].

Конъюгаты НЧЗ с рекАГ получали, добавляя по каплям 10 мл раствора НЧЗ с pH 8,0 к раствору рекАГ до концентрации рекАГ 25 мкг/мл для НЧЗ-1, до 30 мкг/мл для НЧЗ-2 и до 40 мкг/мл для НЧЗ-3. Далее смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 30 мин на приборе «Multi-Reax» («Heildorf»), вносили 10% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА; «Sigma») до конечной концентрации 0,25% и инкубировали 15 мин в прежних условиях. Затем раствор центрифугировали 30 мин при 4ºС и скорости 8–11 тыс. об/мин в зависимости от размера НЧЗ. Осадок суспендировали в 1 мл фосфатного буфера с 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия и регистрировали спектры поглощения. Полученные конъюгаты НЧЗ с рекАГ хранили при 4ºС.

Результат посадки рекАГ на поверхность НЧЗ контролировали методом ИФА [25]. В лунках планшета сорбировали поликлональные IgG-АТ кролика к рекАГ в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6. Блокировку планшета осуществляли раствором 0,02 М фосфатно-солевого буфера pH 7,2 с 0,05% Твин-20 с 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия. В лунки вносили по 100 мкл супернатантов, полученных после центрифугирования конъюгатов НЧЗ с рекАГ. В качестве конъюгата в ИФА использовали меченные пероксидазой хрена моноклональные АТ, в качестве хромогена — 0,5 мМ раствор 3,3’,5,5’-тетраметилбензидина. Калибровочные образцы представляли собой серию разведений рекАГ (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,31, 0,15 мкг/мл) в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования раствора коллоидного золота. Концентрацию рекАГ в исследуемых образцах определяли по калибро-

вочному графику зависимости значений оптической плотности при длине волны 450 нм от концентраций рекАГ в калибровочных образцах.

Реакция дот-иммуноанализа

Для проведения дот-иммуноанализа в сэндвич-формате на дисках нитроцеллюлозной мембраны (0,45 мкм) диаметром 13 мм сорбировали АТ в количестве 0,1; 0,05; 0,025 и 0,0125 мкг, в качестве отрицательного контроля наносили 0,1 мкг раствора БСА в 0,02 М фосфатно-солевом буфере pH 7,2. Свободные участки мембран блокировали 0,09% раствором казеината натрия в фосфатно-солевом буфере. Мембраны инкубировали с сывороткой, содержащей специфические IgG-АТ, в течение 1 ч в термошейкере («Eppendorf») при 37ºС, затем 30 мин — с растворами конъюгатов НЧЗ с рекАГ (A_{520} = 0,5 ед. опт. пл.) при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания опытных и контрольных пятен на мембранах оценивали визуально.

Иммунохроматографический анализ

Растворы антител наносили на мембраны для иммунохроматографии с помощью автоматического диспенсера «IsoFlow» («Imagene Technology»): поликлональные IgG-АТ кролика к рекАГ — в контрольной зоне, АТ — в аналитической (тестовой) зоне, — со скоростью 0,2 мкл на 1 мм длины мембраны. На стекловолоконной мембране сорбировали конъюгат НЧЗ с рекАГ в оптимальной концентрации A_{520} = 4 ед. опт. пл., которую определили, меняя разведения конъюгатов в интервале значений A_{520} = 2–8 ед. опт. пл. на 3 положительных образцах сывороток для каждого разведения.

Сборку мультимембранного композита и нарезку тест-полосок осуществляли с помощью ручного ламинатора «MTB 300» («Kinbio Tech Co. Ltd.») и резака гильотинного типа «Cutter ZQ2002» («Kinbio Tech Co. Ltd.»). При проведении ИХА 20 мкл сыворотки крови наносили на участок иммунохроматографической тест-полоски для образца, далее край полосы опускали в 80 мкл фосфатно-солевого буфера, через 2–3 мин тест-полоску выкладывали на горизонтальную поверхность и через 15 мин оценивали результат, который учитывали как положительный при окрашивании любой интенсивности контрольной и аналитической зон и как отрицательный при отсутствии окрашивания аналитической зоны. В случае отсутствия окрашивания контрольной зоны результат не учитывали.

Для цифровой оценки результатов анализа тест-полоски сканировали на приборе «Gel Doc XR» («Bio-Rad») с программным обеспечением «Image Lab Software». Коэффициент позитивности (КП) рассчитывали по отношению интенсивности окрашивания аналитической зоны к фоновому окрашиванию тест-полоски.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ R и «MS Excel 2013».

Результаты

Методы получения коллоидного золота описаны в научной литературе достаточно подробно [11, 26–29]. С учётом приведённых рекомендаций, опирающихся в основном на модификации цитратного метода Френса, для получения НЧЗ диаметром 15–40 нм, оптимальным для эффективной сорбции антител, были синтезированы препараты НЧЗ со средним размером частиц 16 нм (НЧЗ-1), 25 нм (НЧЗ-2) и 41 нм (НЧЗ-3). Синтез НЧЗ проводили, добавляя в реакционную среду (к 50 мл 0,01% $HAuCl_4 \times 3H_2O$) 1% раствор цитрата натрия в объёме 1, 0,75 и 0,5 мл. На магнитной мешалке устанавливали температуру 300ºС и режим перемешивания 375 об/мин, скорость перемешивания усиливали до 500 об/мин при появлении красного окрашивания [27]. Избыток цитрат-анионов на поверхности НЧЗ стабилизирует золь золота, не препятствуя в дальнейшем взаимодействию НЧЗ с макромолекулами белка при получении иммунометрических конъюгатов. Проверка стабильности коллоидных растворов показала, что они сохраняли свои характеристики при хранении в темноте при 4ºС в течение не менее 6 мес.

Важными характеристиками НЧЗ являются положение и конфигурация полосы поверхностного плазмонного резонанса, поэтому для всех препаратов НЧЗ исследовали спектры поглощения (**рис. 1**). Увеличение размера частиц сопровождалось ростом интенсивности окрашивания растворов и смещением максимума поглощения в область более длинных волн: для НЧЗ-1 — 518 нм; НЧЗ-2 — 522 нм; НЧЗ-3 — 528 нм.

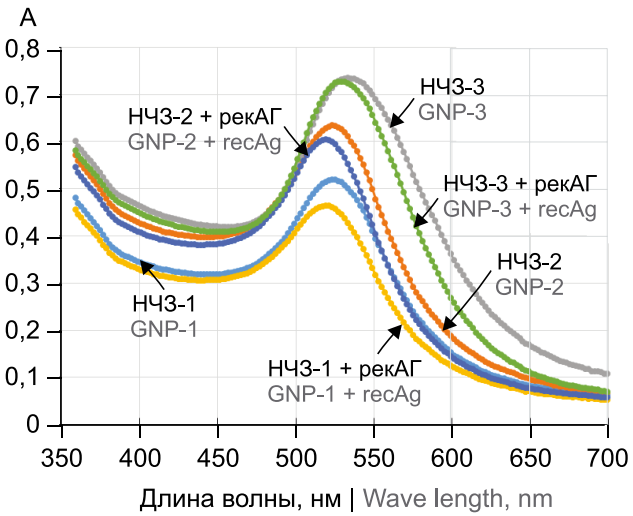


Рис. 1. Спектры поглощения растворов НЧЗ-1, НЧЗ-2, НЧЗ-3 и их конъюгатов с рекАГ.

Fig. 1. Absorption spectra of GNP-1, GNP-2, GNP-3 solutions and their conjugates with recAg.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620
ORIGINAL RESEARCHES

Средний размер и форму НЧЗ оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (**рис. 2**). На снимках с высоким разрешением заметна относительная гомогенность частиц по форме и размерам в каждой группе. Более мелкие частицы имеют преимущественно сферическую форму, в препарате образца НЧЗ-3 отмечается присутствие наночастиц, отклоняющихся по форме от правильной сферической, что согласуется с классификацией строения наночастиц в зависимости от их размера [30].

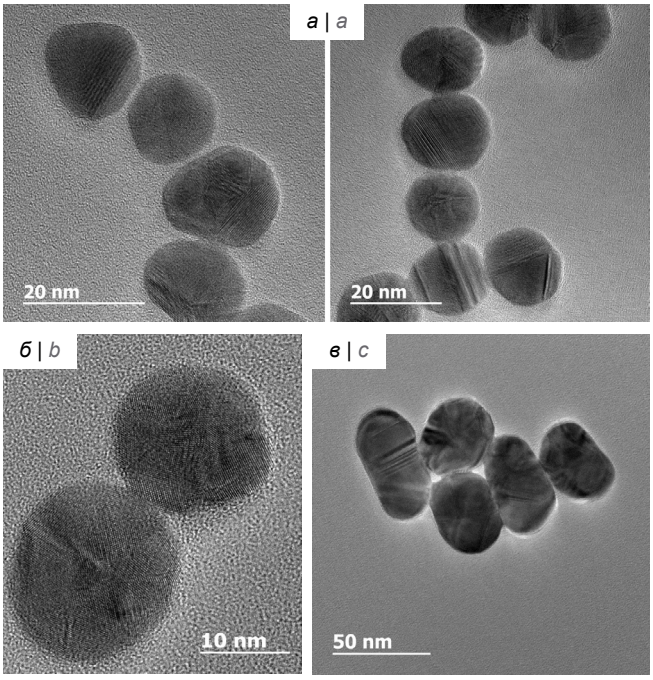


Рис. 2. Фотографии НЧЗ, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии.
а — НЧЗ-1; *б* — НЧЗ-2; *в* — НЧЗ-3.

Fig. 2. Photographs of GNP obtained by means of TEM.
a — GNP-1; *b* — GNP-2; *c* — GNP-3.

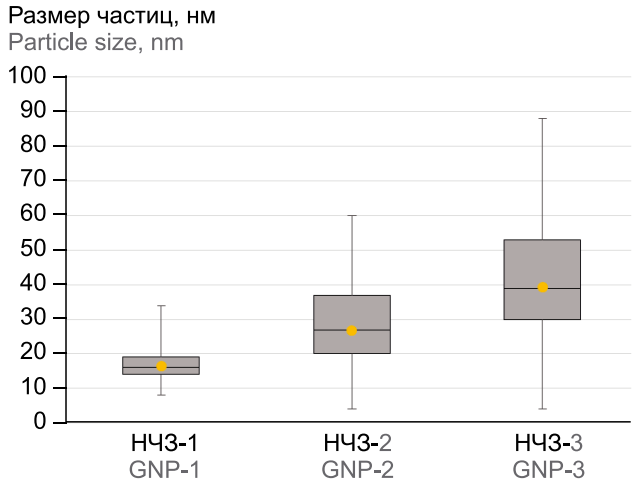


Рис. 3. Распределение НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3 по размерам (функции Box Plot).

Fig. 3. Size distribution diagrams for GNP-1, GNP-2, and GNP-3 (Box Plot functions).

Величина среднего размера частиц, оцененная с помощью просвечивающей электронной микроскопии, составила 16, 25 и 41 нм для НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3 соответственно, что хорошо согласовывалось со значениями, заданным условиями синтеза, и свидетельствовало о высокой технологичности и воспроизводимости использованного метода.

Настоящее исследование ограничивалось получением НЧЗ трех размеров с целью сопоставления результатов с данными, приведёнными в литературе [31–33].

Три группы НЧЗ были охарактеризованы с использованием пакета программ R с построением диаграмм размаха (функции Box Plot) (**рис. 3**). Степень дисперсии максимальна для частиц самого большого размера НЧЗ-3 (30–56 нм). Для НЧЗ-1 разброс минимален (14–18 нм), размеры для НЧЗ-2 находились в интервале 20–37 нм. Количественные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения по критерию W Шапиро–Уилка ($p \leq 0{,}05$) и положению медиан для НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3. Для всех препаратов НЧЗ распределение размеров немного отличалось от нормального.

Получение маркеров на основе НЧЗ для использования в ИХА чаще всего базируется на нековалентной (адсорбционной) конъюгации белков с поверхностью наночастиц в связи с технологической простотой данного подхода, а также с сохранением нативной структуры и свойств макромолекул в составе получаемых комплексов, в частности, их иммунореактивности [27, 34, 35]. Нековалентные связи при этом образуются за счёт электростатических взаимодействий между отрицательно заряженной наночастицей и положительно заряженными участками на поверхности белка, гидрофобных притяжений между белком и поверхностью металла, донорно-акцепторных взаимодействий между металлом и электронами атомов азота и серы в составе белка [26]. Образование комплексов НЧЗ с белками сопровождается формированием стабилизирующей белковой оболочки вокруг них, что неоднократно подтверждено экспериментально [35, 36]. В настоящей работе для получения конъюгатов препаратов НЧЗ с рекАГ также была использована методика пассивной иммобилизации.

С целью получения устойчивого золя были оптимизированы условия адсорбции рекАГ на поверхности НЧЗ с учётом физико-химических свойств белка: молекулярной массы, растворимости, изоэлектрической точки (pI = 5,43) и концентрации, стабилизирующей коллоидную систему. Стабилизирующую концентрацию белка определяли в интервале значений pH 5,5–9,0 для НЧЗ всех трех размеров. На **рис. 4** в качестве примера представлены кривые зависимости показателя

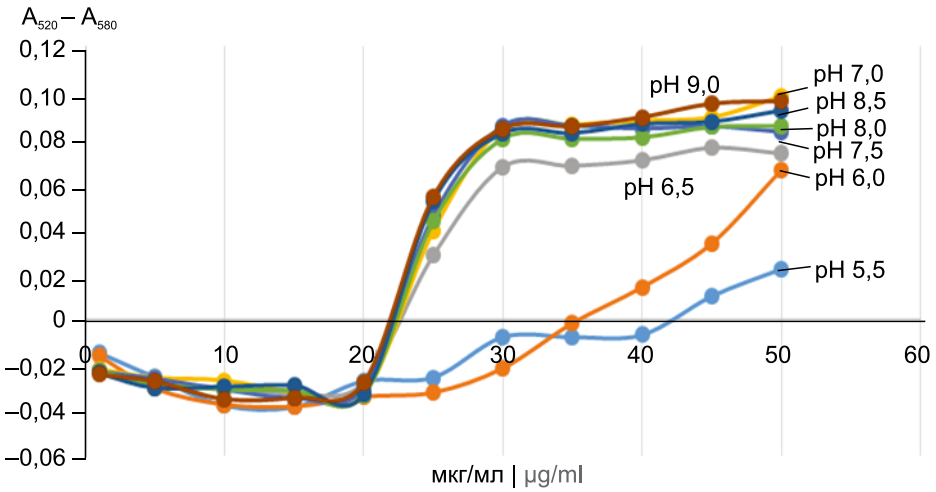


Рис. 4. Зависимость разности оптического поглощения $A_{520} – A_{580}$ раствора НЧЗ-2 (25 нм) от концентрации рекАГ при разных значениях pH раствора.

Fig. 4. Dependence between the optical absorption difference $A_{520} – A_{580}$ of the GNP-2 solution (25 nm) and the concentration of recAg at different pH values of the solution.

$A_{520} – A_{580}$ от концентрации белка при различных значениях pH для НЧЗ-2.

Добавление NaCl в растворы НЧЗ с низкими концентрациями рекАГ приводило к агрегации нестабилизированных белком НЧЗ, что отражалось в увеличении поглощения при λ = 580 нм. При этом происходило изменение окраски раствора с красного на серо-голубой. Достижение стабилизирующих концентраций рекАГ сопровождалось возрастанием и далее сохранением величины показателя $A_{520} – A_{580}$, стабильностью золя и цвета раствора в присутствии электролита.

В кислой среде система была менее стабильна, что, возможно, обусловлено меньшей устойчивостью золей в растворах со значением pH, близким к изоэлектрической точке рекАГ (5,36). При pH ≥ 7 различие между полученными кривыми было незначительно, поэтому синтез конъюгатов НЧЗ с рекАГ проводили при pH = 8. Стабилизирующие концентрации рекАГ определялись значениями, при которых кривые выходили на плато (20 мкг/мл для НЧЗ-1, 25 мкг/мл для НЧЗ-2 и 30 мкг/мл для НЧЗ-3). С увеличением размера НЧЗ концентрация рекАГ, стабилизирующая коллоидную систему, возрастала. В дальнейшем, в соответствии с рекомендациями [34], для получения конъюгатов были использованы концентрации рекАГ, на 10–15% превышающие стабилизирующую.

Результат взаимодействия белка с НЧЗ при получении конъюгатов исследовали, сравнивая спектры поглощения НЧЗ и их конъюгатов с рекАГ. Связывание НЧЗ в растворе с молекулами белка приводит к достаточному для детекции смещению пика поверхностного плазмонного резонанса НЧЗ. Величина этого сдвига обусловлена размером частиц и может быть параметром при оценке связывающей активности адсорбированного белка [35]. В литературе описан метод определения состава конъюгатов НЧЗ с белками, основанный на оценке собственной флуоресценции несвязанных белковых молекул [36]. Белки могут быть по-разному ориентированы на поверхности НЧЗ в зависимости от их размера, что, в свою очередь, может приводить к различной биологической активности конъюгатов, и, таким образом, размер НЧЗ может влиять на реакционную способность адсорбированных белков. На полученных спектрах поглощения растворов конъюгатов НЧЗ с рекАГ максимум поглощения смещён в длинноволновую область, причём более выраженно для НЧЗ меньшего размера (рис. 1). Эффективность связывания макромолекул белка с поверхностью НЧЗ оценивали по остаточному белку в супернатантах после центрифугирования препаратов конъюгатов [25]. Концентрация остаточного белка в надосадочных жидкостях после 2 циклов центрифугирования для НЧЗ-1 в среднем составила 2,0 и 1,0 мкг/мл, для НЧЗ-2 — 3,0 и 0,8 мкг/мл, для НЧЗ-3 — 4,6 и 2,2 мкг/мл. Количество связавшегося рекАГ соответствовало 88% для НЧЗ-1, 87% — для НЧЗ-2, 84% — для НЧЗ-3, что свидетельствовало о высокой эффективности процесса.

Иммунореактивность конъюгатов подтверждали методом дот-иммуноанализа с образцами сывороток крови людей, содержащих IgG-АТ к ВГЕ. На всех мембранах наблюдалось окрашивание пятен с сорбированными АТ, его яркость несколько снижалась при последовательных разведениях сорбированных АТ (0,1; 0,05; 0,025 и 0,0125 мкг). Подтверждена реакционная способность всех полученных конъюгатов и возможность их применения с использованием нитроцеллюлозной мембраны в

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

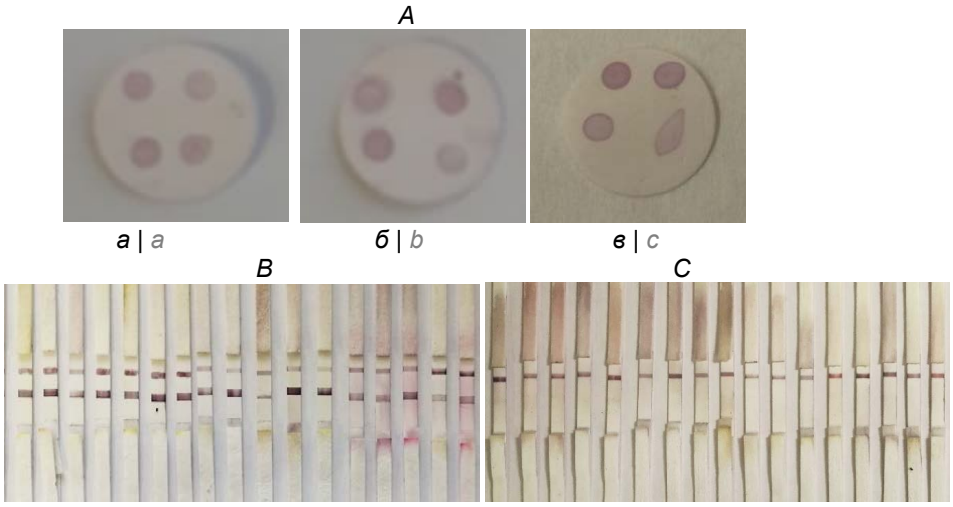


Рис. 5. Результаты дот-иммуноанализа (*A*) с применением конъюгатов НЧЗ с рекАг (*а* — НЧЗ-1; *б* — НЧЗ-2; *в* — НЧЗ-3) и ИХА положительных (*B*) и отрицательных (*C*) образцов сывороток с применением НЧЗ-3, конъюгированных с рекАГ.

Fig. 5. Results of dot immunoassay using (*A*) GNP conjugated with recAg (*a* — GNP-1; *b* — GNP-2; *c* — GNP-3) and immunochromatographic analysis of positive (*B*) and negative (*C*) serum samples using GNP-3 conjugated with recAg.

качестве твёрдой фазы (**рис. 5**). О специфичности конъюгатов свидетельствовало отсутствие окрашивания контрольного антигена (БСА).

Конъюгат НЧЗ-3 с рекАГ, при использовании которого имело место стабильное яркое окрашивание реакционной зоны в дот-иммуноанализе, был выбран для проведения модельных экспериментов по ИХА на положительных (n = 17) и отрицательных (n = 17) образцах сывороток крови, предварительно протестированных методом ИФА, по чувствительности, как правило, превосходящей ИХА. В качестве тест-системы сравнения был выбран набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы») как один из лучших на мировом рынке наборов для диагностики ВГЕ [37].

Предварительно подобраны условия формирования контрольной и аналитической зон тест-полоски: концентрации сорбируемых АТ и поликлональных IgG-АТ кролика к рекАГ, скорости их нанесения и условия высушивания мембран. На основании полученных результатов было выбрано разведение конъюгата с A_{520} = 4, при котором наблюдалось достаточно яркое окрашивание тестовой и контрольной полос и отсутствовало фоновое окрашивание мембраны в реакциях с образцами сывороток крови. При увеличении концентрации АТ в аналитической зоне (0,25; 0,5; 1 мг/мл) и поликлональных IgG-АТ кролика к рекАГ в контрольной зоне (0,5; 1; 2 мг/мл) происходило усиление окрашивания. При концентрациях АТ 0,5 мг/мл и поликлональных IgG-АТ кролика к рекАГ 2 мг/мл наблюдалось достаточное для визуальной детекции окрашивание контрольной и тестовой полос, поэтому они были выбраны как наиболее приемлемые. При этом учитывали, что при значительном увеличении концентрации сорбированных АТ существует вероятность их частичной десорбции и миграции с потоком по мембране [26, 28].

Аналитические характеристики полученных иммунохроматографических тест-полосок оценивали в реакциях с пробами сывороток крови, содержащими (n = 17) и не содержащими (n = 17) IgG-антитела к ВГЕ (**рис. 5**). На 34 исследованных образцах, результаты анализа которых представлены на рис. 5, показана 100% чувствительность и 100% специфичность тест-полосок. Все результаты были разделены на три группы по степени окрашивания аналитической зоны: «1+» (КП = 7,8–15,1; Me = 9,6); «2+» (КП = 26,7–35,1, Me = 31,0); «3+» (КП = 58,3–77,7, Me = 62,8). Для большинства (73%) положительных образцов интенсивность окрашивания составила «2+» и «3+», что соответствовало интенсивности окрашивания, удобной для визуальной детекции.

Обсуждение

ИХА основан на движении аналита вдоль мембраны, которое вызывает образование на определённых участках мембраны специфических иммунокомплексов, регистрируемых по окрашиванию. Наиболее часто в иммунохроматографических тестах применяют конъюгаты антигенов и антител с НЧЗ. Методы получения НЧЗ с различными размерами частиц и синтез на их основе конъюгатов с биологическими макромолекулами достаточно полно представлены в литературе [9, 12, 13]. Поскольку оптические свойства НЧЗ зависят от их размера и формы, в проведённом исследовании были синтезированы НЧЗ нескольких размеров, исследованы их физико-химические свойства, получены на их основе конъюгаты с рекАГ ВГЕ и проведена оценка

реакционной способности полученных конъюгатов в дот-иммуноанализе и ИХА.

С увеличением диаметра частиц максимум поглощения несколько сдвигался в более длинноволновую область (518 и 522 и 528 нм для НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3 соответственно), что согласуется с данными, приведёнными в литературе [23], а цвет растворов, соответственно, менялся от оранжево-красного у наименьшего размера частиц до пурпурного у коллоидного раствора золота с размером частиц около 41 нм. Согласно данным литературы, увеличение размера частиц до 50 нм и более может приводить к снижению аналитического сигнала [32, 33], поэтому мы ограничились полученными НЧЗ трёх размеров: 16, 25 и 41 нм. Полученные НЧЗ по данным сканирующей электронной микроскопии имели размеры, сопоставимые с размерами, рассчитанными по методу Френса [11].

К настоящему времени предложен ряд методов для экспериментальной оценки количества макромолекул, которые сорбируются на поверхности наночастицы [35, 38], и расчёта концентрации белка для посадки на НЧЗ. При синтезе конъюгата НЧЗ с молекулами антигена важно решение двух основных задач: получение устойчивого золя и сохранение антигенной активности молекул белка. Нами были отработаны оптимальные условия синтеза с учётом влияния на стабильность золя концентрации антигена и pH раствора. Минимальную концентрацию белка, при которой не изменялся цвет смеси, рассматривали как стабилизирующую, т. е. определяющую границы устойчивости золя. Белковая оболочка вокруг коллоидных НЧЗ гидратирована, благодаря чему после нанесения на пористую стекловолоконную мембрану и сушки частицы при последующем взаимодействии с образцом и буфером снова переходят в раствор, не теряя своей реакционной способности. В результате проведённого эксперимента были получены стабильные в течение 6 мес препараты конъюгатов антигена с НЧЗ трёх размеров.

Первичную оценку способности полученных конъюгатов к специфическому взаимодействию с АТ выполняли методом дот-иммуноанализа в формате захвата, что позволило сделать вывод о высокой активности препаратов и их пригодности для использования в тестах с применением нитроцеллюлозных мембран в качестве твёрдой фазы. В реакциях ИХА при увеличении размера НЧЗ аналитический сигнал значительно возрастал, и самая яркая полоса в тестовой зоне наблюдалась при использовании конъюгата с размером частиц 41 нм, что подтверждало возрастание коэффициента экстинкции растворов НЧЗ с увеличением размеров частиц. Увеличение аналитического сигнала при использовании для приготовления конъюгата НЧЗ большего диаметра также может быть связано с тем, что человеческий глаз острее воспринимает более контрастный, характерный для них пурпурный цвет.

Заключение

В работе получены и охарактеризованы НЧЗ размером 16, 25 и 41 нм. Разработаны условия получения конъюгатов НЧЗ с рекАГ, показаны высокая эффективность и специфичность их взаимодействия с IgG-АТ к ВГЕ. Для конъюгата НЧЗ-3 с рекАГ подтверждена возможность использования в ИХА.

Полученный конъюгат планируется использовать при разработке тест-системы для быстрого одновременного определения IgG- и IgM-АТ к ВГЕ. IgG-АТ появляются в крови заболевших через несколько дней после появления IgM-АТ. Длительность персистенции IgM-АТ составляет 6–9 мес, IgG-АТ могут сохраняться в крови переболевших десятилетиями [16]. На ранних сроках заболевания одновременное выявление IgG- и IgM-АТ к ВГЕ является дополнительным инструментом диагностического алгоритма. Обнаружение IgG-АТ может свидетельствовать как об острой или перенесённой инфекции, так и о поствакцинальном иммунитете. Важная область применения экспресс-тестов для определения IgG — проведение эпидемиологических исследований при минимальной лабораторной оснащённости.

Данные результаты получены впервые и могут быть использованы при создании нового ИХА-теста для экспресс-диагностики ГЕ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Thomas D.L., Yarbough P.O., Vlahov D., et al. Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin. Microbiol.* 1997;35(5):1244–7. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.35.5.1244-1247.1997
2. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. J. Hepatol. 2018;68(6):1256–71. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005
3. Takahashi M., Kusakai S., Mizuo H., et al. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(1):49–56. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.43.1.49-56.2005
4. Chandra N.S., Sharma A., Malhotra B., Rai R.R. Dynamics of HEV viremia, fecal shedding and its relationship with transaminases and antibody response in patients with sporadic acute hepatitis E. *Virol. J.* 2010;7:213. DOI: https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-213
5. Chionne P., Madonna E., Pisani G., et al. Evaluation of rapid tests for diagnosis of acute hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 2016;78:4–8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.005
6. Rosi N.L., Mirkin C.A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem. Rev.* 2005;105(4):1547–62. DOI: https://doi.org/10.1021/cr030067f
7. Jans H., Huo Q. Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41(7):2849–66. DOI: https://doi.org/10.1039/c1cs15280g
8. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Colloidal gold in solid-phase analysis. *Biochemistry (Moscow).* 1997;62(4):350–6. EDN: https://elibrary.ru/leawar
9. Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem. Soc. Rev.* 2008;37(9):2028–45. DOI: https://doi.org/10.1039/b712179m

10. Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 1996;12(3):788–800. DOI: https://doi.org/10.1021/la9502711
11. Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem. Soc. Rev.* 2008;37(9):2028–45. DOI: https://doi.org/10.1039/b712179m
12. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys. Sci.* 1973;241(105):20–2. DOI: https://doi.org/10.1038/physci241020a0
13. Park J.W., Shumaker-Parry J.S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2014;136(5):1907–21. DOI: https://doi.org/10.1021/ja4097384
14. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Григоренко В.Г., Осипов А.П. Определение прогестерона методом латерального проточного иммуноанализа. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия.* 2012;53(5):326–34. EDN: https://elibrary.ru/puirof
Safronova V.A., Samsonova J.V., Grigorenko V.G., Osipov A.P. Lateral flow immunoassay for progesterone detection. *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2012;67(5):241–8. DOI: https://doi.org/10.3103/S0027131412050045 EDN: https://elibrary.ru/rgicvf
15. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита Е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019;96(1):10–7. Alatortseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;96(1):10–7. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17 EDN: https://elibrary.ru/hmyroi
16. Khuroo M.S., Khuroo M.S., Khuroo N.S. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J. Gastroenterol.* 2016;22(31):7030–45. DOI: https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7030
17. Kamar N., Izopet J., Pavio N., et al. Hepatitis E virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017;3:17086. DOI: https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86
18. Mikhailov M.I., Karlsen A.A., Potemkin I.A., et al. Geographic and temporal variability of hepatitis E virus circulation in the Russian Federation. *Viruses*. 2022;15(1):37. DOI: https://doi.org/10.3390/v15010037
19. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Рекомбинантный белок, содержащий антигенно-значимые фрагменты белков вируса гепатита Е, используемый в тест-системах для серодиагностики гепатита Е (варианты). Патент РФ 2711907 C2;2020. Alatortseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Recombinant protein containing antigen-significant fragments of hepatitis E virus proteins, used in test systems for hepatitis E serodiagnosis (embodiments). Patent RU № 2711907 C2;2020.
20. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem*. 1974;22(12):1084–91. DOI: https://doi.org/10.1177/22.12.1084
21. Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н. и др. Определение доли гепатита Е в этиологической структуре острых вирусных гепатитов в отдельных регионах Кыргызстана. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019;64(12):740–6. Alatortseva G.I., Lukhverchik L.N., Nesterenko L.N., et al. The estimation of the hepatitis E proportion in the etiological structure of acute viral hepatitis in certain regions of of Kyrgyzstan. *Clinical Laboratory Diagnostics.* 2019;64(12):740–6. DOI: https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-740-746 EDN: https://elibrary.ru/ptiyxm
22. Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Рогачева Т.А. и др. Распространённость антител к вирусу гепатита Е у населения регионов Республики Беларусь. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(2):160–71. Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Rogacheva T.A., et al. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the population of the Republic of Belarus. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2022;99(2):160–71. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-236 EDN: https://elibrary.ru/wpzhlf
23. Алаторцева Г.И., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н. и др. Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита Е (Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A) методом линейного иммуноанализа. *Вопросы вирусологии.* 2020;65(3):132–42. Alatortseva G.I., Dotsenko V.V., Nesterenko L.N., et al. Line immunoassay for detection of IgG antibodies to hepatitis E virus (Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A). *Problems of Virology.* 2020;65(3):132–42. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-132-142 EDN: https://elibrary.ru/svgsma
24. De Mey J., Moeremans M. The preparation of colloidal gold probes and their use as marker in electron microscopy. In: Koehler, J.K., eds. *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy III.* Berlin, Heidelberg; 1986: 229–71. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-71135-0_6
25. Yao N., Wang Z.L., ed. *Handbook of Microscopy for Nanotechnology.* Boston; 2006.
26. Сотников Д.В. *Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения:* Автореф. дисс. … канд. хим. наук. М.;2016. Sotnikov D.V. *Determination of specific antibodies by immunochromatography: quantitative patterns and practical applications:* Diss. Moscow;2016.
27. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии. *Успехи химии.* 2007;76(2):199–213. EDN: https://elibrary.ru/knoucz
Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Gold nanoparticles: preparation, functionalisation and applications in biochemistry and immunochemistry. *Russian Chemical Reviews.* 2007;76(2):181–94. DOI: https://doi.org/10.1070/RC2007v076n02ABEH003673 EDN: https://elibrary.ru/lkoyxr
28. Богачева Н.В., Смирнова Д.Н., Дармов И.В., Крупина К.А. Способ получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм. Патент РФ 2644466 C2;2016. Bogacheva N.V., Smirnova D.N., Darmov I.V., Krupina K.A. Method for obtaining nanoparticles of colloid gold with average diameter 25–30 nm. Patent RU 2644466 C2;2016. EDN: https://elibrary.ru/ckmfyd
29. Zaraysky E.I. Nanogold and its conjugates in immunochromatography: synthesis, analysis, separation, conjugation with macromolecules. *Eurasian Union of Scientists.* 2018;(12-3):42–7. DOI: https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2018.3.57.42-47 EDN: https://elibrary.ru/csxzyv
30. Kumar D., Mutreja I., Sykes P. Seed mediated synthesis of highly mono-dispersed gold nanoparticles in the presence of hydroquinone. *Nanotechnology*. 2016;27(35):355601. DOI: https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/35/355601
31. Mori T., Hegmann T. Determining the composition of gold nanoparticles: a compilation of shapes, sizes, and calculations using geometric considerations. *J. Nanopart. Res*. 2016; 18(10):295. DOI: https://doi.org/10.1007/s11051-016-3587-7
32. Rajasekharreddy P., Usha Rani P., Sreedhar B. Qualitative assessment of silver and gold nanoparticle synthesis in various plants: a photobiological approach. *J. Nanopart. Res.* 2010;12:1711–21. DOI: https://doi.org/10.1007/s11051-010-9894-5
33. Safenkova I., Zherdev A., Dzantiev B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay:

a case study with potato virus X. *Anal. Bioanal. Chem*. 2012;403(6):1595–605.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00216-012-5985-8

34. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Сравнительная характеристика наночастиц коллоидного золота разного диаметра как носителей и маркеров в иммунохроматографическом анализе. *Естественные и технические науки.* 2012;(1):62–71. Byzova N.A., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. A comparative analysis of colloidal gold nanoparticles of various diameters as carriers and markers in immunochromatographic assay. *Natural and Technical Sciences.* 2012;(1):62–71. EDN: https://elibrary.ru/owmcqx
35. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., et al. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. *Talanta*. 2010;81(3):843–8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.025
36. Kaur K., Forrest J.A. Influence of particle size on the binding activity of proteins adsorbed onto gold nanoparticles. *Langmuir*. 2012;28(5):2736–44. DOI: https://doi.org/10.1021/la203528u
37. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development and application of a label-free fluorescence method for determining the composition of gold nanoparticle-protein conjugates. *Int. J. Mol. Sci*. 2014;16(1):907–23. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms16010907
38. Al-Sadeq D.W., Majdalawieh A.F., Mesleh A.G., et al. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J. Med. Microbiol*. 2018;67(4):466–80. DOI: https://doi.org/10.1099/jmm.0.000706
39. Chakraborty S., Joshi P., Shanker V., et al. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*. 2011;27(12):7722–31. DOI: https://doi.org/10.1021/la200787t

Информация об авторах

Алаторцева Галина Ивановна✉ — канд. биол. наук, зав. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, alatortseva@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-9887-4061

Нестеренко Любовь Николаевна — канд. хим. наук, в. н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, innesterenko3001@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-3825-3906

Амиантова Ирина Ильинична — н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, amianti@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3483-0128

Притворова Людмила Николаевна — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, lexx294@yandex.by, https://orcid.org/0000-0002-2997-8892

Доценко Вера Васильевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, verramal@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-5866-944X

Зверев Виталий Васильевич — д-р биол. наук, профессор, академик РАН, зав. отделом вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, научный руководитель НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, vitalyzverev@outlook.com, https://orcid.org/0000-0002-0017-1892

Свитич Оксана Анатольевна — д-р мед. наук, член-корр. РАН, зав. отделом иммунологии и аллергологии, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, svitichoa@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1757-8389

Участие авторов: *Алаторцева Г.И.* — концепция и дизайн исследования, анализ научной литературы, анализ и обобщение результатов исследований, написание и редактирование статьи; *Нестеренко Л.Н.* — дизайн исследования, анализ научной литературы, отработка условий проведения ИХА, систематизация и анализ результатов исследования, написание статьи; *Амиантова И.И.* — отработка условий проведения ИХА, систематизация результатов исследования; *Притворова Л.Н.* — подготовка и тестирование испытуемых образцов, анализ результатов; *Доценко В.В.* — подготовка и тестирование испытуемых образцов, анализ результатов; *Зверев В.В.* — концепция исследований, общее руководство, анализ результатов; *Свитич О.А.* — концепция исследований, общее руководство, анализ результатов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисковой и аналитической работы в подготовке статьи, прочитали и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.10.2024;
принята к публикации 28.12.2024;
опубликована 28.02.2025

Information about the authors

Galina I. Alatortseva✉ — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, alatortseva@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-9887-4061

Lyubov N. Nesterenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, innesterenko3001@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-3825-3906

Irina I. Amiantova — researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, amianti@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3483-0128

Lyudmila N. Pritvorova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, lexx294@yandex.by, https://orcid.org/0000-0002-2997-8892

Vera V. Dotsenko — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, verramal@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-5866-944X

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Head, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, scientific director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, vitalyzverev@outlook.com, https://orcid.org/0000-0002-0017-1892

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Corresponding Member of the RAS, Head, Immunology and Allergology department, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, svitichoa@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1757-8389

Authors' contribution: *Alatortseva G.I.* — research concept and design, analysis of scientific literature, analysis and generalization of research results, writing and editing an article; *Nesterenko L.N.* — research design, analysis of scientific literature, elaboration of the conditions for conducting an IHA, systematization and analysis of research results, writing an article; *Amiantova I.I.* — elaboration of the conditions for conducting an IHA, systematization results of the study; *Pritvorova L.N.* — preparation and testing of test samples, analysis of results; *Dotsenko V.V.* — preparation and testing of test samples, analysis of results; *Zverev V.V.* — research concept, general guidance, analysis of results; *Svitich O.A.* — research concept, general guidance, analysis of results. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 20.10.2024;
accepted for publication 28.12.2024;
published 28.02.2025

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Исследование протективных свойств иммунодоминантных белков ортопоксвирусов при различных способах иммунизации

Зрелкин Д.И.[#], Зубкова О.В.[#✉], Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., 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. Всемирная организация здравоохранения в 2022 г. объявила оспу обезьян чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения. Вирус оспы обезьян (MPV) принадлежит к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Ортопоксвирусы во время репликации образуют 2 отдельные формы вирусных частиц: экзоцитозом выделяется оболочечный внеклеточный вирион (EEV), а зрелый внутриклеточный вирион (IMV) высвобождается в результате лизиса клеток. У этих двух форм вирионов отличаются наборы поверхностных белков, что обусловливает их различия в иммуногенности и инфекционности.

Цель работы — оценка иммуногенной и протективной активности 9 поверхностных антигенов вируса осповакцины.

Материал и методы. Геномы рекомбинантных аденовирусов человека 2-го серотипа, несущих поверхностные антигены вируса осповакцины, получали методом гомологичной рекомбинации в бактериальных клетках с последующей сборкой аденовирусных частиц в клетках HEK293. Иммуногенные и протективные свойства полученных рекомбинантных аденовирусов изучали на мышах BALB/c. Сыворотки крови после иммунизации животных исследовали методом иммуноферментного анализа на наличие антител к вирусу осповакцины. Протективные свойства оценивали на летальной модели инфекции мышей после интраназального заражения вирусом осповакцины штамма Western Reserve.

Результаты. Наиболее иммуногенными и протективными антигенами вируса осповакцины в составе рекомбинантных аденовирусов человека 2-го серотипа были гликопротеин B5 оболочечного внеклеточного вириона и мембранно-ассоциированный белок H3 зрелого внутриклеточного вириона. При изучении защитной эффективности антигенов показана 100% эффективность B5 и H3 при интраназальной иммунизации.

Заключение. При использовании панели рекомбинантных аденовирусных векторов, несущих гены поверхностных белков вируса осповакцины, показано, что оптимальная защита может быть достигнута с помощью комбинации антигенов оболочечного и зрелого вирионов. Данный подход может быть использован при разработке новых поливалентных вакцин против различных вирусных инфекций.

Ключевые слова: *вирус оспы обезьян, вирус осповакцины, рекомбинантный аденовирус, иммуногенность, протективность*

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 № 34 от 16.01.2023).

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: Зрелкин Д.И., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Исследование протективных свойств иммунодоминантных белков ортопоксвирусов при различных способах иммунизации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):18–30.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643
EDN: https://www.elibrary.ru/ONKJVE

[#] Авторы статьи, внёсшие равный вклад в подготовку публикации.

© Зрелкин Д.И., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Study of the protective properties of immunodominant proteins of orthopoxviruses in various methods of immunization

Denis I. Zrelkin[#], Olga V. Zubkova[#]✉, Tatiana A. Ozharovskaia, Olga Popova, Daria V. Voronina, Polina P. Goldovskaya, Irina V. Vavilova, Anastasia S. Chugunova, Inna V. Dolzhikova, Dmitry N. Shcherbinin, Dmitry V. Shcheblyakov, Denis Y. Logunov, Alexander L. Gintsburg

National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. In 2022, the World Health Organization declared monkeypox a public health emergency. The monkeypox virus (MPV) is part of the *Orthopoxvirus* genus within the *Poxviridae* family. During replication, orthopoxviruses produce two distinct forms of viral particles: the extracellular enveloped virion (EEV), released via exocytosis, and the intracellular mature virion (IMV), released through cell lysis. These forms differ in surface proteins composition, influencing their immunogenicity and infectivity.

Aim. To evaluate the immunogenic and protective activity of nine surface antigens of vaccinia virus.

Materials and methods . Recombinant human adenoviruses type 2 (rAd2) carrying surface antigens of vaccinia virus were obtained using homologous recombination in bacteria, followed by adenoviral particle assembly in HEK293 cells. The immunogenic and protective properties of these adenoviruses were tested in BALB/c mice. The presence of antibodies to the vaccinia virus was assessed using ELISA, and survival rates were evaluated in a lethal infection model after intranasal challenge with the vaccinia virus strain Western Reserve.

Results. The most immunogenic and protective antigens of the vaccinia virus within rAd2 were glycoprotein B5 of the EEV and membrane-associated protein H3 of the IMV, both showing 100% protective efficacy after intranasal immunization.

Conclusion. Using a panel of recombinant adenoviruses carrying genes of vaccinia virus surface proteins, it was shown that optimal protection is achieved using a combination of enveloped and mature virion antigens. This method could be used for development of new multivalent preparations against various viral infections.

Keywords: *monkeypox virus, vaccinia virus, recombinant adenovirus, immunogenicity, protective activity*

Ethical 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 Biomedical Ethics Committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 34, January 16, 2023).

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

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

For citation: Zrelkin D.I., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Chugunova A.S., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Study of the protective properties of immunodominant proteins of orthopoxviruses in various methods of immunization. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):18–30.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-634
EDN: https://www.elibrary.ru/ONKJVE

Введение

Ортопоксвирусы (ОПВ) относятся к семейству *Poxviridae*, подсемейству *Chordopoxvirinae,* роду *Orthopoxvirus,* который содержит 13 видов: *Orthopoxvirus abatinomacacapox*, *Orthopoxvirus akhmetapox*, *Orthopoxvirus camelpox*, *Orthopoxvirus cowpox*, *Orthopoxvirus ectromelia*, *Orthopoxvirus monkeypox*, *Orthopoxvirus raccoonpox*, *Orthopoxvirus skunkpox*, *Orthopoxvirus taterapox*, *Orthopoxvirus vaccinia*, *Orthopoxvirus variola*, *Orthopoxvirus volepox* и неофициально классифицированный вирус оспы Аляски[1]. Виды делятся на 2 родственные клады: ОПВ «Старого Света» (евразийские и африканские) и североамериканские ОПВ [1]. Многие из этих вирусов могут вызывать серьёзные заболевания у домашних животных, а также зоонозные инфекции у человека. Заражение людей чаще всего

[1] ICTV. Subfamily: Chordopoxvirinae. Genus: Orthopoxvirus. URL: https://ictv.global/report/chapter/poxviridae/poxviridae/orthopoxvirus

[#] Authors of the article who made an equal contribution to the preparation of the publication.

© Zrelkin D.I., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Chugunova A.S., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L., 2025

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

происходит при разведении скота, контакте с домашними животными, а также при торговле экзотическими животными в результате непосредственного контакта с ними. При попадании в неэндемичные регионы энзоотические ОПВ могут представлять угрозу для местных и эндемичных видов [2–4].

ОПВ разных видов антигенно и иммунологически близки друг к другу. Вакцинация против натуральной оспы, к примеру, обеспечивает перекрёстную защиту и от других представителей рода [5]. Однако после глобального искоренения натуральной оспы в 1980 г. многие страны начали постепенно прекращать плановую вакцинацию от этого заболевания [6]. В результате на сегодняшний день значительная часть населения лишена иммунной защиты к ОПВ. Именно это обстоятельство объясняет учащение в различных регионах мира вспышек, среди которых особо выделяется оспа обезьян. Произошедшая в 2022 г. глобальная вспышка была признана Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение [7]. Продолжающаяся эпидемия оспы обезьян в странах Африки может привести к ускоренной вирусной эволюции и адаптации к передаче зоонозного заболевания от человека к человеку [8]. Несмотря на существующие вакцинные препараты, ВОЗ рекомендовала разработку менее реактогенных вакцин для повышения эффективности и длительности защиты с целью контроля текущей вспышки.

ОПВ имеют большой и сложный протеом, содержащий более 200 белков, из которых более 30 относятся к структурным [9, 10]. Во время инфекции вирус существует в двух антигенно различных инфекционных формах [11–13]. Внутриклеточные зрелые вирионы (IMV) являются основными инфекционными вирусными частицами и играют ключевую роль в передаче вируса от человека к человеку. Поверхностная мембрана этой формы содержит по меньшей мере 11 белков: A14.5 (~10 кДа), E10 (12 кДа), I5 (13 кДа), A13 (14 кДа), A27 (14 кДа), A9 (~18 кДа), A14 (17–25 кДа), A17 (23–29 кДа), L1 (25–29 кДа), D8 (34 кДа) и H3 (35 кДа) [9–13]. Внеклеточные оболочечные вирионы (EEV) образуются из IMV и имеют дополнительную липопротеиновую мембрану, отвечающую за распространение вируса внутри организма [12]. Поверхностные белки EEV и IMV обеспечивают инфекционность ОПВ и служат основными мишенями для индукции протективного иммунитета [14, 15]. Поскольку антитела, нейтрализующие IMV, не нейтрализуют EEV, считается, что для максимальной защиты необходима иммунизация антигенами обеих этих форм [16].

Иммунодоминантными белками, на которые вырабатываются антитела, в том числе вируснейтрализующие, являются два гликопротеина EEV — A33 и B5, а также белки IMV: L1, H3, D8 и комплекс из 3 белков незрелого вириона A14, A17 и D13 либо комплекс A14, A17 и A27 зрелого вириона [14, 17–19]. Белки A33 и B5 играют роль в образовании оболочечного вириона и последующей инфекции [14]. Среди поверхностных белков зрелого вириона 3 белка опосредуют прикрепление вируса к клетке-хозяину. Белок D8 образует димеры на вирусной мембране и обеспечивает инфекционность вириона за счёт связывания с хондроитинсульфатом клеточной мембраны [20]. Белки A27 и H3 связывают гепарансульфат. A27 — мажорный белок мембраны, необходим для образования оболочечного внеклеточного вириона и участвует в прикреплении вируса к клетке и последующем слиянии вирусной и клеточной мембран. A27 формирует комплекс с трансмембранными белками A14 и A17, которые являются важными структурными элементами мембраны зрелого вириона. A17 также необходим для проникновения вируса в клетку и служит якорем для A27 [21]. H3 связывается с поверхностью клетки через гепарансульфаты и, как и белки D8 и A27, участвует в проникновении вируса в клетку. H3 является основным белком при развитии иммунного ответа в организме человека [22]. L1 — трансмембранный белок, который необходим для формирования зрелых вирионов и участвует в проникновении вируса в клетку [23].

Хотя большинство этих антигенов (A27, L1, B5 и A33) были изучены в составе различных поливалентных вакцин [18, 24, 25], некоторые иммунодоминантные белки не были включены в эти исследования. Кроме того, при высокой иммуногенности ОПВ сами по себе антигены обладают низкой иммуногенностью. Вакцинация очищенными белками или ДНК, кодирующими белки вируса осповакцины, требует многократной иммунизации для индукции протективного иммунного ответа [24, 26, 27]. В отличие от ДНК-вакцин и субъединичных вакцин, было показано, что вакцинация рекомбинантными аденовирусами (rAd) способствует формированию как напряжённого гуморального и клеточного иммунного ответа, так и защитного иммунитета после однократной иммунизации [28–30]. Учитывая важность быстрой индукции защитного иммунитета в условиях потенциальной вспышки, мы изучили возможность однократной иммунизации rAd, экспрессирующими антигены EEV и IMV вируса осповакцины.

Целью данной работы являлась оценка иммуногенной и протективной активности 9 поверхностных антигенов вируса осповакцины. Для реализации данной цели были сконструированы rAd, несущие гены поверхностных белков зрелого (D8, H3, L1, A14, A17, A27 и D13) и внеклеточного (A33 и B5) вирионов вируса осповакцины. Далее проводили исследование индивидуальных иммуногенных и

протективных свойств полученных аденовирусов при интраназальном и внутримышечном способах иммунизации. Данный подход может использоваться при разработке новых поливалентных вакцин против различных вирусных инфекций.

Материалы и методы

Культуры клеток и вирусы

Клетки линии Vero E6 (почка зелёной мартышки) культивировали в среде DMEM («Cytiva»), содержащей 4% фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Gibco»), 25 000 ЕД пенициллина и 25 мг стрептомицина («Панэко») при 5% CO_2. Клетки линии HEK293 (почка эмбриона человека) культивировали в среде DMEM («Cytiva»), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Gibco»), 25 000 ЕД пенициллина и 25 мг стрептомицина («Панэко») при 5% CO_2.

Вирус осповакцины штамм Western Reserve (VACV WR) (GenBank #OP584857.1) накапливали в клетках Vero E6. Аликвоты вируссодержащей среды хранили при –80ºС. Биологическую активность вируса определяли стандартным методом титрования на культуре клеток путём подсчёта бляшек [31].

Получение рекомбинантных аденовирусов

rAd конструировали с использованием технологии, описанной ранее [32]. Гены антигенов вируса осповакцины были амплифицированы с генома VACV WR (GenBank #OP584857.1) с использованием праймеров, указанных в **табл. 1**, и клонированы под контроль промотора цитомегаловируса человека. Плазмидные векторы с геномом rAd человека 2-го серотипа (rAd2) и целевым антигеном получали методом гомологичной рекомбинации в бактериальных клетках. rAd собирали и накапливали в клетках HEK293. Очистку и концентрирование вирусов проводили методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия в соответствии со стандартной методикой [33]. Количество вирусных частиц определяли стандартным спектрофотометрическим методом [34].

Животные

Мыши инбредной линии BALB/c, самцы и самки массой тела 16–18 г, были получены из питомника НПП «Питомник лабораторных животных г. Пущино» ФИБХ РАН. Животные содержались на базе вивария НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в соответствии с требованиями по содержанию лабораторных животных и имели свободный доступ к корму и воде. 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» Минздрава России (протокол № 34 от 16.01.2023).

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации генов вируса осповакцины
Table 1. Primer sequences for amplification of vaccinia virus genes

Название | Name	Последовательность | Sequence
A33-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGATGACACCAGAAAACGACG
A33-R	GATATCTCTAGATTAACAAAAATACTTTCTAACTTCTTGTG
H3-F	ACTAAGCTTATATGGCGGCGGCGAAAACT
H3-R	ATCTAGATATCTG TTAGATAAATGCGGTAAC
B5-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGAAAACGATTTCCGTTGTTACG
B5-R	TCTAGATTACGGTAGCAATTTATGGAACTTATA
D8-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGCCGCAACAACTATCTCCTATTAA
D8-R	GATATCGCTAGCTTACTAGTTTTGTTTTTCTCGCGAATATCG
A14-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGGACATGATGCTTATGATTGG
A14-R	GATATCTCTAGATTATTAGTTCATGGAAATATCGCTATG
A27-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGGACGGAACTCTTTTCCC
A27-R	TCTAGATTATTACTCATATGGGCGCCGTC
L1-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGGGTGCCGCGGCAAGCAT
L1-R	GATATCTCTAGATTATCAGTTTTGCATATCCGTGGTAGC
A17-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGAGTTATTTAAGATATTACAATATG
A17-R	GATATCTCTAGATTATTAATAATCGTCAGTATTTAAACTG
D13-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGAATAATACTATCATTAATTCTTTG
D13-R	ACTAGTTTATTAGTTATTATCTCCCATAATCTTG

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Иммунизация и заражение животных

Пятинедельным мышам BALB/c интраназально под лёгким ингаляционным наркозом или внутримышечно вводили rAd в дозе 2×10^{10} вирусных частиц. Повторно те же аденовирусы вводили в той же дозе через 21 день. Образцы сыворотки собирали на 28-й день после 1-й иммунизации. Иммунизированные мыши были подвергнуты интраназальному заражению VACV WR в дозе 16 $ЛД_{50}$ (5×10^4 БОЕ) спустя 35 дней после 1-й иммунизации. В течение 14 дней после заражения проводили ежедневный осмотр животных и фиксировали клинические симптомы оспенной инфекции (снижение двигательной активности, сгорбленность, взъерошенность шерсти, конъюнктивит), изменение массы тела и гибель. Животных умерщвляли, если они теряли более 25% массы тела.

Иммуноферментный анализ

Титр специфических IgG-антител к вирусу осповакцины в образцах сыворотки определяли с помощью иммуноферментного анализа. 96-луночные планшеты сенсибилизировали VACV WR (10^5 БОЕ/планшет), разведённым в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6), в течение ночи при 4ºС. Образцы сыворотки двукратно серийно разводили до 1 : 102 400, добавляли в заблокированные 96-луночные планшеты и инкубировали при 37ºС в течение 1 ч. Затем планшеты промывали и в каждую лунку добавляли вторичные антитела, конъюгированные с комплексом рекомбинантного стрептавидина с пероксидазой хрена. Инкубировали в течение 1 ч при 37ºС. После этого в планшеты вносили тетраметилбензидина гидрохлорид. Реакцию останавливали добавлением H_2SO_4, поглощение (450 нм) считывали с помощью планшетного фотометра «Multiskan FC» («ThermoFisher»). За конечный титр принимали наибольшее разведение сыворотки, значение оптической плотности в которой в 2 раза и более превышало значение в соответствующем разведении сыворотки крови интактных (неиммунизированных) мышей.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных и построение диаграмм проводили в программе «GraphPad Prism 8». Статистическую значимость различий между исследуемыми группами определяли с помощью Т-критерия Вилкоксона для зависимых выборок или U-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Дизайн и получение rAd, экспрессирующих гены поверхностных антигенов

Основными иммунодоминантными белками вируса осповакцины являются 2 гликопротеина оболочечного внеклеточного вириона — A33 и B5, а также белки зрелого внутриклеточного вириона: D8, H3, L1, A14, A17, A27 и D13. Указанные антигены обладают высокой степенью гомологии между разными видами ОПВ (**табл. 2**) [35–37].

Гены описанных выше белков были получены из генома вируса осповакцины и клонированы в геном rAd2 под контроль промотора цитомегаловируса человека (**рис. 1**). Геном rAd2 несет делецию области E1, которая делает аденовирус дефектным по репликации (в этот сайт делеции клонируется экспрессионная кассета с целевым геном). Для увеличения пакующей ёмкости дополнительно проводили делецию области E3.

Таким образом, нами были получены 9 rAd2, 2 из которых несли поверхностные антигены оболочечного вириона (rAd2-B5 и rAd2-A33), а 7 — антигены зрелого вириона (rAd2-H3, rAd2-L1, rAd2-D8, rAd2-D13, rAd2-A14, rAd2-A17 и rAd2-A27).

Таблица 2. Гомология между белками разных видов ОПВ
Table 2. Homology between proteins of different orthopoxvirus species

Антиген вируса осповакцины VACV antigen	Антиген (% гомологии) | Antigen (% homology)		
	Orthopoxvirus monkeypox	Orthopoxvirus cowpox	Orthopoxvirus variola
L1	M1 (98,4%)	CPVX099 (98,4%)	M1 (99,2%)
H3	H3 (93,83%)	CPVX112 (94,46%)	I3 (93,85%)
D8	E8 (94,41%)	CPVX125 (97,37%)	F8 (93,09%)
D13	E13 (98,91%)	CPVX131 (98,73%)	N3 (98,91%)
A14	A15 (100%)	CPVX146 (100%)	A14 (97,78%)
A17	A18 (97,55%)	CPVX150 (95,59%)	A17 (97,55%)
A27	A29 94,55%)	CPVX162 (95,45%)	A30 (93,64%)
A33	A35 (92,47%)	CPVX168 (91,49%)	A36 (89,25%)
B5	B6 (96,53%)	CPVX199 (93,69%)	B7 (92,74%)

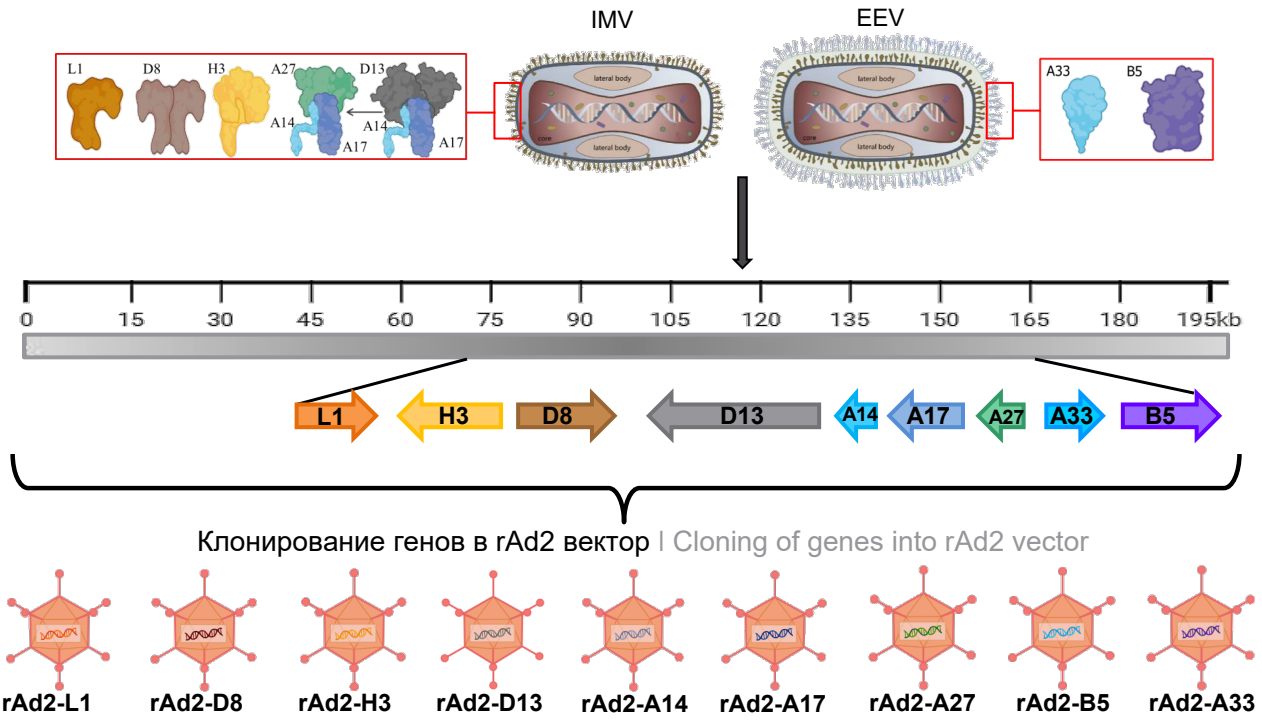


Рис. 1. Схема получения rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса осповакцины.

L1 — миристоилированный белок; H3 — мембранно-ассоциированный белок p35 IMV; D8 — трансмембранный карбоангидразоподобный белок; D13 — белок мембраны IMV; A14 — структурный трансмембранный белок p16 IMV; A17 — трансмембранный белок IMV (фактор морфогенеза); A27 — белок мембраны IMV; B5 — мембранный гликопротеин типа I; A33 — мембранный гликопротеин типа II.

Fig. 1. Scheme for the production of recombinant adenoviruses expressing surface antigens of the vaccinia virus.

L1 — myristoylated protein; H3 — membrane-associated protein p35 IMV; D8 — transmembrane carbonic anhydrase-like protein; D13 — IMV membrane protein; A14 — structural transmembrane protein p16 IMV; A17 — transmembrane protein IMV (morphogenesis factor); A27 — membrane protein IMV; B5 — type I membrane glycoprotein; A33 — type II membrane glycoprotein.

Векторы rAd2 индуцируют гуморальный иммунный ответ in vivo

Для оценки иммуногенности сконструированных rAd (rAd2-A33, rAd2-B5, rAd2-H3, rAd2-L1, rAd2-D8, rAd2-D13, rAd2-A14, rAd2-A17, rAd2-A27) мышам внутримышечно или интраназально вводили аденовирусы в дозе 2×10^{10} вирусных частиц однократно или двукратно. Титры специфических IgG-антител к вирусу осповакцины определяли методом иммуноферментного анализа на 28-е сутки после иммунизации (**рис. 2, 3**).

Однократная внутримышечная иммунизация приводила к формированию специфических IgG-антител у мышей, которым вводили rAd2-B5, rAd2-H3, rAd2-D8, rAd2-D13 и rAd2-A14. Значения титров в этих группах имели значимые отличия от контрольной группы, где титры составляли менее 1 : 50 (рис. 2, *а*). Высокий уровень IgG-антител обнаружен в группе мышей, иммунизированных rAd2-H3 (средние геометрические титры (СГТ) 1 : 3676). Введение rAd2-B5 приводило к индукции IgG-антител с СГТ = 1 : 348,2. Минимальный уровень IgG-антител наблюдали для групп rAd2-D8 (СГТ = 1 : 100), rAd2-A14 (СГТ = 1 : 107,2) и rAd2-D13 (СГТ = 1 : 57,43) без достоверных различий между группами. Двукратная иммунизация привела к значительному росту уровня IgG-антител по сравнению с однократной только для групп rAd2-H3 (СГТ = 1 : 14703) и rAd2-B5 (СГТ = 1 : 2111) (рис. 2, *б*). Существенных различий между другими группами не обнаружено.

При однократной интраназальной иммунизации специфические IgG-антитела в сыворотке крови не были детектированы ни в одной группе. При двукратной интраназальной иммунизации специфические IgG-антитела обнаружены в сыворотке крови животных, которым вводили rAd2-B5 и rAd2-H3. Значения титров в этих группах имели значимые отличия от контрольной группы, где титры составляли менее 1 : 50 (рис. 3). Высокий уровень антител обнаружен в группе мышей, иммунизированных rAd2-H3 (СГТ = 1 : 1902,73). Введение rAd2-B5 приводило к индукции IgG-антител с СГТ = 1 : 183,4.

Протективная эффективность rAd2 in vivo

Следующим шагом была проверка защитной эффективности антигенов. Через 35 дней от начала двукратной иммунизации мышей заражали патоген-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643
ORIGINAL RESEARCHES

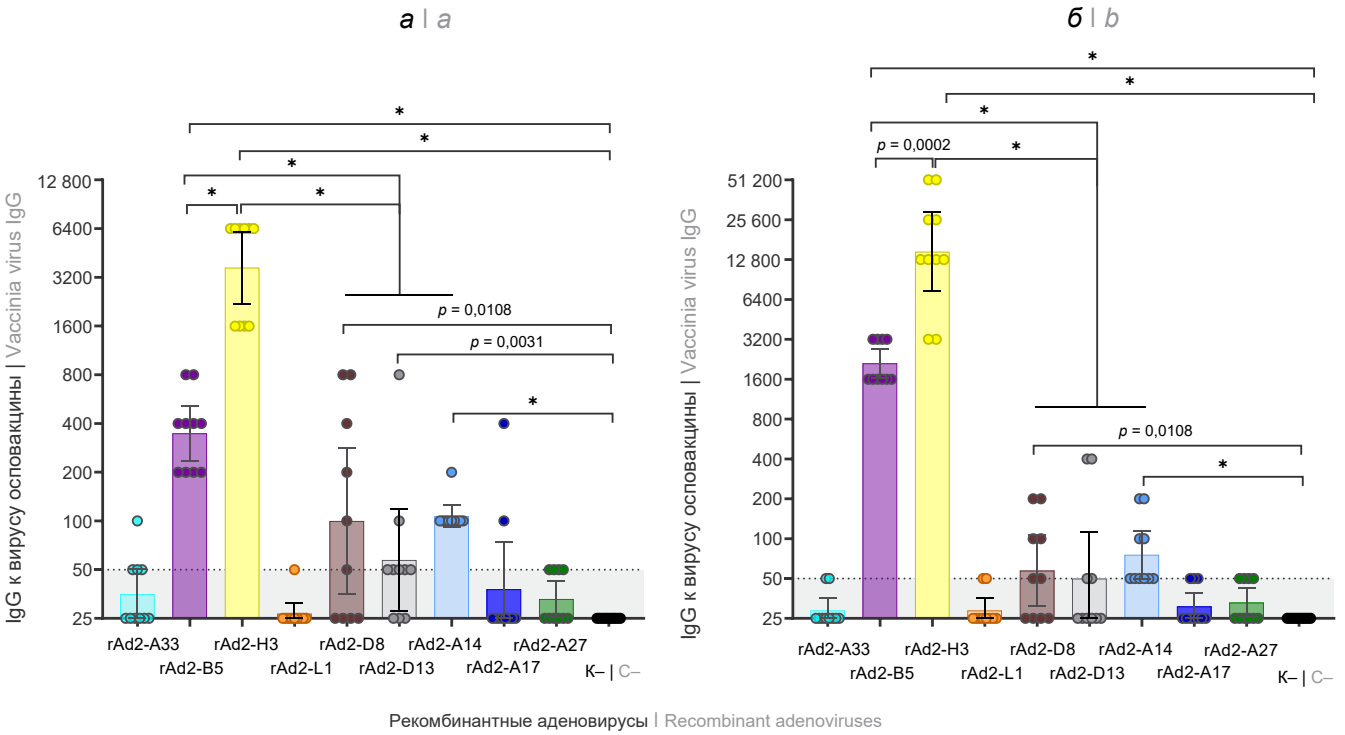


Рис. 2. Иммуногенность rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса осповакцины, после однократной (*а*) и двукратной (*б*) внутримышечной иммунизации.

На рисунках указана достоверность при $p < 0,05$; *$p < 0,0001$. К– — контроль.

Fig. 2. Immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing surface antigens of the vaccinia virus after single (*a*) and double (*b*) intramuscular immunization.

The figures show the confidence at $p < 0.05$; *$p < 0.0001$. C– — control.

ным штаммом WR в дозе 16 $ЛД_{50}$ (5×10^4 БОЕ). Инфицирующая доза была выбрана на основании предварительных экспериментов по определению $ЛД_{50}$ *in vivo* [38]. Выживаемость и изменение массы тела регистрировали в течение 14 дней после заражения.

Как и ожидалось, в контрольной группе ярко выраженные клинические признаки заболевания с потерей массы тела более 13% проявлялись уже с 4-го дня. Как показано на **рис. 4**, все контрольные животные быстро теряли массу и умирали на 5–8-й день после заражения.

При внутримышечной иммунизации rAd2-B5, экспрессирующим гликопротеин B5 EEV, мы наблюдали 20% защиту животных от летальной инфекции (рис. 4, *а*, *б*). Двукратная внутримышечная иммунизация rAd2-D8, экспрессирующим гликопротеин D8 IMV, обеспечила 40% выживаемость животных. Животные, иммунизированные rAd2, экспрессирующими другие поверхностные антигены, потеряли 25% от своего первоначального веса в течение 5–7 дней после заражения. По результатам исследования сделан вывод о том, что при использовании внутримышечного способа введения одного антигена недостаточно для защиты.

Интересно, что интраназальная иммунизация значительно уменьшала тяжесть инфекции и защищала животных как от летального исхода, так и от потери веса (рис. 4, *в*, *г*). В частности, при иммунизации rAd2-B5 мы наблюдали 100% защитную эффективность. Стоит отметить, что в группе животных, иммунизированных rAd2-B5, незначительную потерю веса (не более 3%) на 3–5-й дни наблюдали только у половины животных. В группе rAd2-H3 выживаемость составила 87,5% (пала 1 мышь из 8). Кроме того, на 5-й день у 1 животного потеря веса была около 15% с постепенным восстановлением к 14-му дню. В группах rAd2-A33, rAd2-L1, rAd2-D8 и rAd2-D13 выживаемость составила 75%. Временная потеря веса к 5-му дню для групп не превышала 25%. У животных из групп rAd2-A17 и rAd2-A27 наблюдали 50% летальность при потере веса не более 15%. Животные, иммунизированные rAd2-A14, потеряли 21% от своего первоначального веса в течение 5 дней после заражения. Выживаемость в этой группе составила всего 25%.

Эти данные свидетельствуют о том, что rAd2-B5 и rAd2-H3 являются оптимальными векторами для защиты от интраназального заражения вирусом осповакцины, демонстрируя важность B5 и H3 в качестве протективных антигенов в этой модели ортопоксвирусной инфекции. Поэтому далее мы проверили эффективность сочетанной иммунизации (внутримышечно + интраназально) для индукции как системного, так и местного ответа.

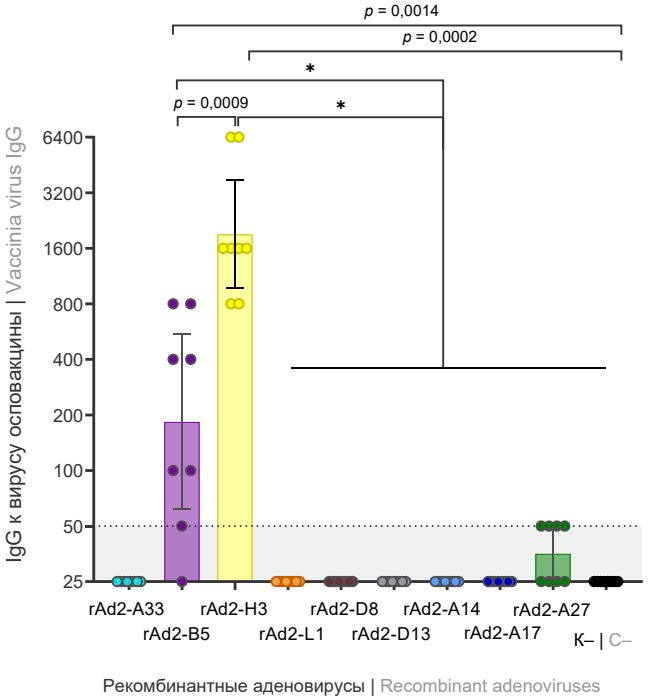


Рис. 3. Иммуногенность rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса осповакцины, после двукратной интраназальной иммунизации.
На рисунке указана достоверность при $p < 0,05$; *$p < 0,0001$. К– — контроль.

Fig. 3. Immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing surface antigens of the vaccinia virus after two intranasal immunizations.
The figure shows the confidence at $p < 0.05$; *$p < 0.0001$. C– — control.

Мышам внутримышечно вводили rAd2-B5 или rAd2-H3 в дозе 2×10^{10} вирусных частиц, через 21 день тот же аденовирусный вектор вводили интраназально. Через 35 дней от начала иммунизации животных заражали патогенным штаммом WR в дозе 16 $ЛД_{50}$ (5×10^4 БОЕ). Выживаемость и изменение массы тела регистрировали в течение 14 дней после заражения (**рис. 5**).

Сочетанная иммунизация rAd2-B5 или rAd2-H3 обеспечивала 100% защиту животных от летальной инфекции. В группе животных, внутримышечно и интраназально иммунизированных rAd2-B5, потеря веса не была зарегистрирована. Однако в группе rAd2-H3 на 6-й день у 2 животных из 8 потеря веса была около 23% с постепенным восстановлением к 14-му дню.

Обсуждение

С момента использования вируса осповакцины в прошлом столетии сопутствующая вакцинация больше не проводится. Несмотря на ликвидацию натуральной оспы, мир продолжает сталкиваться с ортопоксвирусными инфекциями, которые требуют активных действий. Серьёзные побочные эффекты после вакцинации вирусом осповакцины подчеркнули необходимость разработки более безопасных вакцинных препаратов для борьбы с актуальными ортопоксвирусными инфекциями, такими как оспа обезьян.

Российские учёные внесли большой вклад в разработку противооспенных вакцин [39–41]. В настоящее время наименее реактогенной и безопасной является недавно разработанная вакцина «ОртопоксВак» научного центра «Вектор» Роспотребнадзора для профилактики ортопоксвирусных инфекций, которая представляет из себя штамм Л-ИВП вируса осповакцины с 6 нарушенными генами вирулентности [42].

Высокая степень гомологии в центральной области генома вирусов оспы обезьян и осповакцины, составляющая 96,3%, указывает на их генетическое сходство [35–37]. В частности, гены *MPV A35, B6, M1, E8, H3, A15, A18, A29* и *E13* демонстрируют значительную консервативность с ортологичными генами ОПВ, включая вирусы осповакцины и натуральной оспы [24].

Для разработки ортопоксвирусных вакцин использованы несколько технологий: живая вакцина, аттенуированный вирус с дефектом репликации, вакцина на основе ДНК и субъединичные вакцины. У каждой из них есть свои недостатки, такие как серьёзные нежелательные явления при применении живой вакцины, более низкая иммуногенность у аттенуированных нереплицирующихся вакцин и ДНК-вакцин, а также длительный цикл разработки рекомбинантных белков [24, 26, 43, 44].

rAd обладают рядом ключевых свойств, что делает их хорошими кандидатами для разработки векторных вакцин. rAd физически и генетически стабильны, эффективно индуцируют врождённый и адаптивный иммунный ответ при различных способах введения, в том числе при доставке через поверхности слизистых оболочек [45]. Последнее является значительным преимуществом перед другими типами вакцин, т. к. эффективность вакцинации зависит от места введения и привлечения антигенпрезентирующих клеток [46]. Внутримышечная иммунизация приводит к стимуляции системного иммунного ответа, но не обеспечивает эффективный барьерный иммунитет. При этом интраназальная иммунизация может вызвать гуморальный и клеточный иммунитет как на слизистых оболочках, так и системно [47]. Таким образом, разработка мукозальных вакцин позволит удовлетворить потребности в более эффективной защите от патогенов, проникающих через слизистые оболочки.

Аденовирусная технология представляет собой универсальную платформу для быстрой разработки и внедрения вакцин для борьбы с вирусными инфекциями, обладающими в том числе пандемическим потенциалом. В этом исследовании мы разра-

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

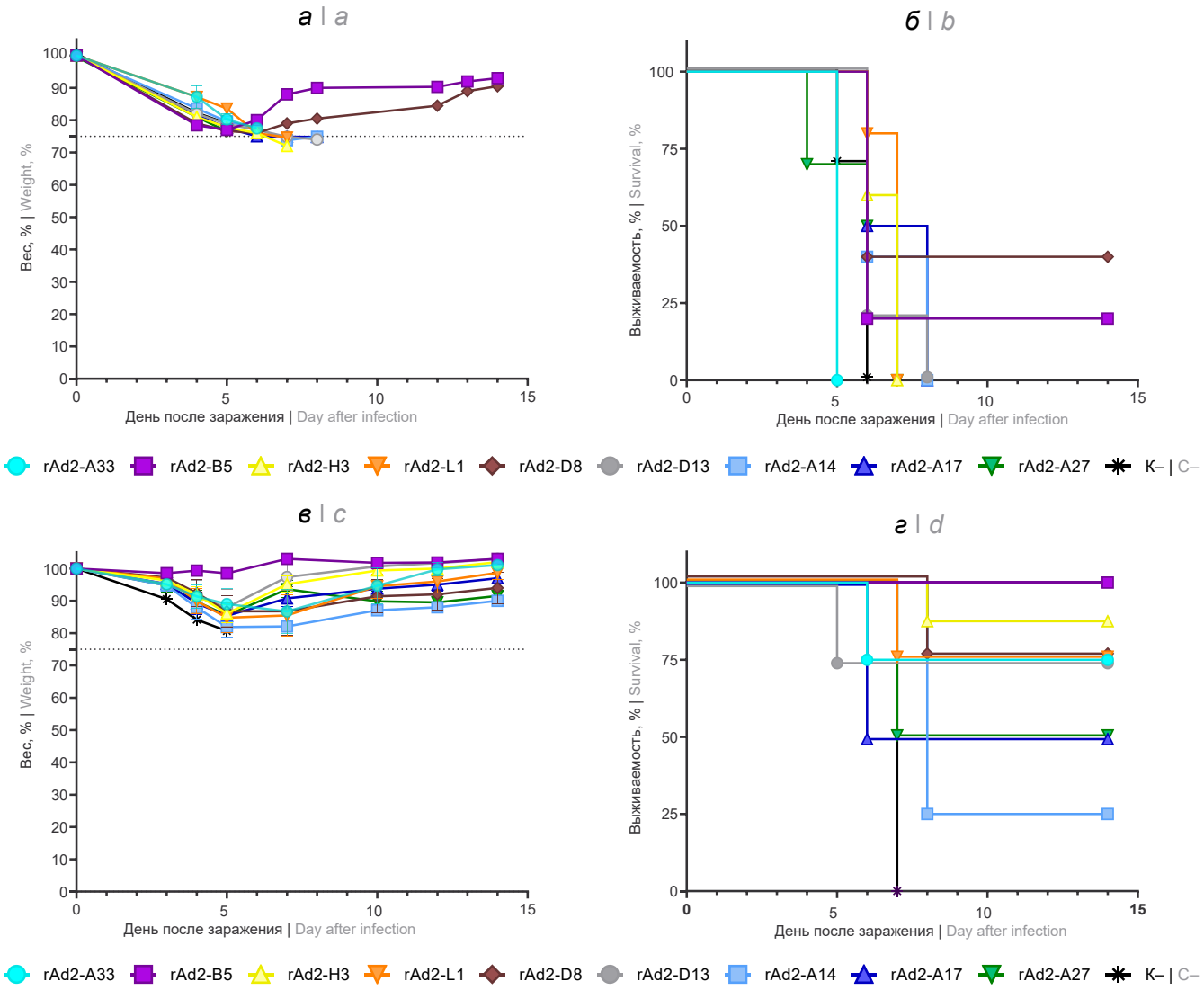


Рис. 4. Протективность rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса осповакцины, после внутримышечной (*а*, *б*) или интраназальной (*в*, *г*) иммунизации на модели летальной инфекции у мышей.

а, *в* — динамика веса (на графике указаны среднее значение и стандартная ошибка среднего значения); *б*, *г* — выживаемость. К– — контроль.

Fig. 4. The protective efficacy of recombinant adenovirus vectors expressing the surface antigens of the vaccinia virus after intramuscular (*a*, *b*) or intranasal (*c*, *d*) immunization in a mouse model of lethal infection.

a, *c* — weight dynamics (the graph shows the average value and the standard error of the average value); *b*, *d* — survival. C– — control.

ботали панель рекомбинантных репликативно-дефектных векторов на основе аденовируса человека 2-го серотипа, кодирующих поверхностные белки вируса осповакцины. Два белка внеклеточного оболочечного вириона (A33 и B5) и 7 белков внутриклеточного зрелого вириона (L1, D8, H3, A14, A17, A27, D13) были выбраны для клонирования в геном rAd2. Мы оценили иммуногенность 9 поверхностных белков EEV и IMV, большинство из которых в предыдущих исследованиях показали свою эффективность [15, 17, 19, 24, 26, 27]. Однако в нашем исследовании из 9 поверхностных антигенов только B5 и H3 индуцировали иммунный ответ у мышей при системном и интраназальном введении. Мы предполагаем, что это может быть связано с тем, что оба белка B5 и H3 являются гликопротеинами и содержат эпитопы, которые распознаются клетками иммунной системы более эффективно, чем у белков других типов. По данным литературы, *in silico* предсказаны B- и T-клеточные эпитопы для иммунодоминантных белков MPV (M1, H3, E8, A29, A35 и B6) [48].

В экспериментах по исследованию протективности rAd нами продемонстрирована эффективность интраназальной иммунизации. Интраназальная иммунизация rAd2-B5, экспрессирующим гликопротеин B5 EEV, обеспечила наилучшую защиту (100%) с наименьшей потерей веса и быстрым восстановлением. Интраназальная иммунизация rAd2-H3, экспрессирующим гликопротеин

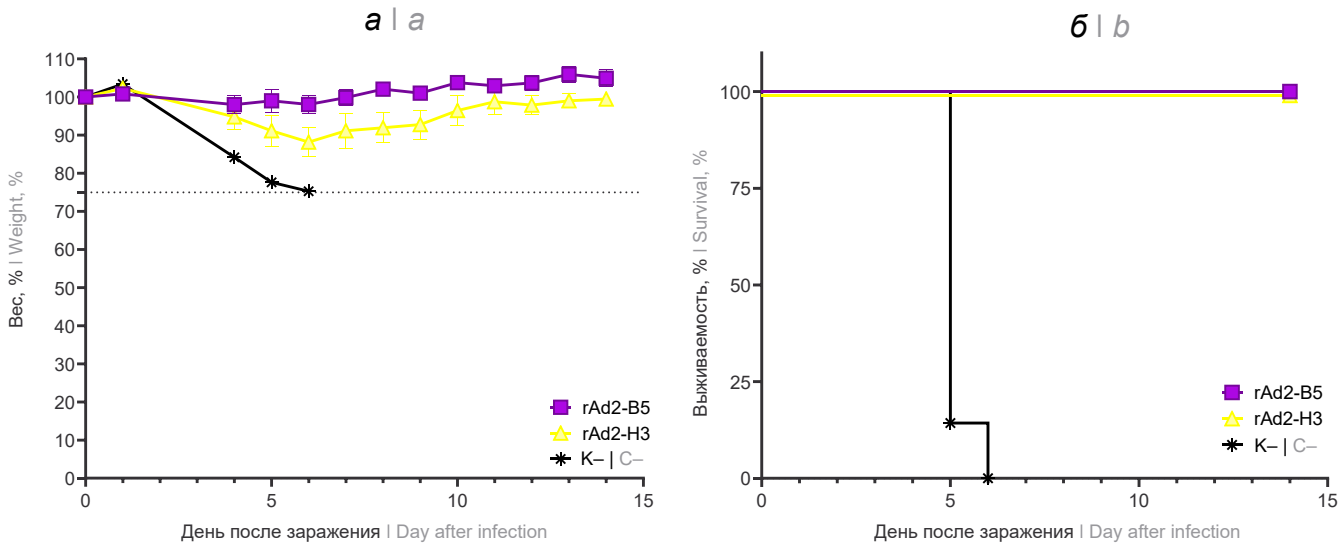


Рис. 5. Протективность rAd2-B5 и rAd2-H3 после сочетанной иммунизации (внутримышечно + интраназально) на модели летальной инфекции у мышей.

а — динамика веса; *б* — выживаемость. К– — контроль.

Fig. 5. The protective efficacy of recombinant adenovirus vectors rAd2-B5 and rAd2-H3 after combined immunization (im+in) in a mouse model of lethal infection.

a — weight dynamics; *b* — survival. C– — control.

H3 IMV, обеспечила 87,5% защиту. Другие поверхностные белки: EEV A33, IMV L1, D8 и D13 защищали животных от летальной инфекции на 75%. Введение rAd с антигенами IMV A17, A27 и A14 обеспечивало только частичную защиту от VACV на 25–50% в зависимости от антигена. Эффективность сочетанной иммунизации (внутримышечно + интраназально) rAd2-B5 или rAd2-H3 составила 100%. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований, в которых было показано, что для защиты от интраназального заражения наиболее важен специфический иммунитет к поверхностным антигенам EEV [49]. Антитела, специфические к B5, играют важную роль в борьбе с лёгочной или внутримозговой инфекцией [50]. Белок H3 активирует дендритные клетки, что приводит к секреции таких цитокинов, как интерлейкины-12p70, -10, -6 и фактор некроза опухоли-α, что в дальнейшем индуцирует пролиферацию $CD8^+$-Т-лимфоцитов, тем самым уничтожая инфицированные вирусом клетки [51].

Полученные результаты демонстрируют защитный потенциал выбранных антигенов и дают ценную информацию для последующей разработки эффективных и безопасных поливалентных вакцин против ОПВ. Наше исследование подтверждает, что B5 и H3 обладают наибольшим защитным потенциалом, а в комбинации с другими поверхностными белками зрелого вириона могут обеспечить максимальную эффективность. Необходимо дальнейшее изучение иммуногенного и протективного потенциала различных комбинаций антигенов. Эта работа закладывает прочный фундамент для последующей оптимизации векторных вакцин, подтверждая целесообразность объединения различных поверхностных антигенов EEV и IMV, что позволит достичь максимальной защиты против ОПВ, включая вирус оспы обезьян.

Заключение

В данной работе создана панель rAd, несущих гены поверхностных белков вируса осповакцины, и проведена оценка их иммуногенности и эффективности. В ходе нашего исследования установлено, что на модели летальной инфекции, вызываемой VACV WR, гликопротеины B5 и H3 демонстрируют наибольшую защиту при интраназальной иммунизации. Кроме того, сочетание с другими антигенами может не только усилить иммунный ответ, но и сформировать перекрёстный иммунитет к другим представителям рода *Orthopoxvirus*, вызывающим инфекции у людей. Эти результаты дают представление о защитном механизме поливалентных векторных вакцин и основу для дальнейшей разработки и внедрения таких препаратов, направленных на усиление защиты против ОПВ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Emerson G.L., Li Y., Frace M.A., et al. The phylogenetics and ecology of the orthopoxviruses endemic to North America. *PLoS One.* 2009;4(10):e7666. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007666
2. McInnes C.J., Wood A.R., Thomas K., et al. Genomic characterization of a novel poxvirus contributing to the decline of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *J. Gen. Virol.* 2006;87(Pt. 8):2115–25. DOI: https://doi.org/10.1099/vir.0.81966-0

3. Smits J.E., Tella J.L., Carrete M., et al. An epizootic of avian pox in endemic short-toed larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain. *Vet. Pathol.* 2005;42:59–65. DOI: https://doi.org/10.1354/vp.42-1-59
4. Thiel T., Whiteman N.K., Tirapé A., et al. Characterization of canarypox-like viruses infecting endemic birds in the Galápagos islands. *J. Wildl. Dis.* 2005;41(2):342–53. DOI: https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.2.342
5. Voigt E.A., Kennedy R.B., Poland G.A. Defending against smallpox: a focus on vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2016;15(9):1197–211. DOI: https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1175305
6. Henderson D.A. The eradication of smallpox – an overview of the past, present, and future. *Vaccine.* 2011;29(Suppl. 4):D7–9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080
7. Nuzzo J.B., Borio L.L., Gostin L.O. The WHO declaration of monkeypox as a global public health emergency. *JAMA.* 2022; 328(7): 615–7. DOI: https://doi.org/10.1001/jama.2022.12513
8. WHO. Executive board, 154th session. Provisional agenda item 18 "Smallpox eradication: destruction of variola virus stocks"; 2024.
9. Rothenburg S., Yang Z., Beard P., et al. Monkeypox emergency: Urgent questions and perspectives. *Cell*. 2022;185(18):3279–81. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.002
10. Zhang R.R., Wang Z.J., Zhu Y.L., et al. Rational development of multicomponent mRNA vaccine candidates against mpox. *Emerg. Microbes Infect.* 2023;12(1):2192815. DOI: https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2192815
11. Galinski M.S. Paramyxoviridae: transcription and replication. *Adv. Virus Res.* 1991;39:129–62. DOI: https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60794-0
12. Curran J., Kolakofsky D. Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* 1999;54:403–22. DOI: https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60373-5
13. Law M., Smith G.L. Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. *Virology.* 2001;280(1):132–42. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.2000.0750
14. Riccardo V., Pablo G.C. Neutralization determinants on poxviruses. *Viruses*. 2023;15(12):2396. DOI: https://doi.org/10.3390/v15122396
15. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* 2011;239(1):8–26. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x
16. Lustig S., Fogg C., Whitbeck J.C., et al. Combinations of polyclonal or monoclonal antibodies to proteins of the outer membranes of the two infectious forms of vaccinia virus protect mice against a lethal respiratory challenge. *J. Virol.* 2005;79(21):13454–62. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13454-13462.2005
17. Mucker E.M., Golden J.W., Hammerbeck C.D., et al. A nucleic acid-based orthopoxvirus vaccine targeting the vaccinia virus L1, A27, B5, and A33 proteins protects rabbits against lethal rabbitpox virus aerosol challenge. *J. Virol.* 2022;96(3):e0150421. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.01504-21
18. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., et al. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell.* 2016;167(3):684–94.e9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.049
19. Sakhatskyy P., Wang S., Chou T.W., Lu S. Immunogenicity and protection efficacy of monovalent and polyvalent poxvirus vaccines that include the D8 antigen. *Virology.* 2006;355(2):164–74. DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.017.
20. Niles E.G., Seto J. Vaccinia virus gene D8 encodes a virion transmembrane protein. *J. Virol.* 1988;62(10):3772–8. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.62.10.3772-3778.1988
21. Takahashi T., Oie M., Ichihashi Y. N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins. *Virology.* 1994;202(2): 844–52. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.1994.1406
22. Chertov O.Yu., Telezhinskaya I.N., Zaitseva E.V., et al. Amino acid sequence determination of vaccinia virus immunodominant protein p35 and identification of the gene. *Biomed. Sci.* 1991;2(2):151–4.
23. Franke C.A., Wilson E.M., Hruby D.E. Use of a cell-free system to identify the vaccinia virus L1R gene product as the major late myristylated virion protein M25. *J. Virol.* 1990;64(12):5988–96. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.64.12.5988-5996.1990
24. Hooper J., Custer D., Thompson E. Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. *Virology*. 2003;306(1):181–95. DOI: https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00038-7
25. Golden J.W., Zaitseva M., Kapnick S., et al. Polyclonal antibody cocktails generated using DNA vaccine technology protect in murine models of orthopoxvirus disease. *Virol. J.* 2011;8:441. DOI: https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-441
26. Berhanu A., Wilson R.L., Kirkwood-Watts D.L., et al. Vaccination of BALB/c mice with Escherichia coli-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge. *J. Virol.* 2008;82(7):3517–29. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.01854-07
27. Fogg C., Lustig S., Whitbeck J.C., et al. Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *J. Virol.* 2004;78(19):10230–7. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10230-10237.2004
28. 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
29. 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
30. Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., et al. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine «Sputnik Light» for prevention of coronavirus infection in healthy adults. *Lancet Reg. Health Eur.* 2021;11:100241. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100241
31. Yakimovich A., Mercer J. High-content analyses of vaccinia plaque formation. In: Mercer J., eds. *Vaccinia Virus. Methods in Molecular Biology, Volume 2023.* New York;2019:237–53. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9593-6_15
32. Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В. и др. Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. *Вестник РГМУ.* 2023;(1):4–11. DOI: https://doi.org/10.24075/vrgmu.2023.006 Ozharovskaia 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
33. Su Q., Sena-Esteves M., Gao G. Purification of the recombinant adenovirus by cesium chloride gradient centrifugation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019;2019(5). DOI: https://doi.org/10.1101/pdb.prot095547
34. Maizel J.V., White D.O., Scharff M.D. The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology.* 1968;36(1):115–25. DOI: https://doi.org/10.1016/0042-6822(68)90121-9
35. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., et al. Analysis of the monkeypox virus genome. *Virology*. 2002;297(2):172–94. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.2002.1446

36. Antoine G., Scheiflinger F., Dorner F., Falkner F.G. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology.* 1998;244(2): 365–96. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.1998.9123
37. Diaz-Cánova D., Mavian C., Brinkmann A., et al. Genomic sequencing and phylogenomics of cowpox virus. *Viruses.* 2022;14(10):2134. DOI: https://doi.org/10.3390/v14102134
38. Zrelkin D.I., Goldovskaia P.P., Kan V.Y. Determination of threshold value of protective level of antibodies to one of members of orthopoxvirus genus. In: *Scientific Research of the SCO Countries: Synergy and Integration.* Beijing;2024. DOI: https://doi.org/10.34660/INF.2024.87.21.085
39. Максютов Р.А., Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Щелкунов С.Н. Сравнение кандидатных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека. *Acta Naturae.* 2017;9(2):93–99. Maksyutov R.A., Yakubitskyi S.N., Kolosova I.V., Shchelkunov S.N. Comparing new-generation candidate vaccines against human orthopoxvirus infections. *Acta Naturae.* 2017;9(2):88–93. DOI: https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-88-93 EDN: https://elibrary.ru/yyylkl
40. Стовба Л.Ф., Чухраля О.В., Черникова Н.К. и др. Безопасность и иммуногенность вакцины третьего поколения IMVAMUNE® на основе вируса вакцины, штамм MVA. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(1):26–41. Stovba L.F., Chukhralya O.V., Chernikova N.K., et al. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE®, a third-generation vaccine based on the modified vaccinia Ankara (MVA) strain. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):26–41. DOI: https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-26-41 EDN: https://elibrary.ru/tjwrhx
41. Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Титова К.А. и др. Увеличение протективности противооспенной вакцины. *Медицинская иммунология.* 2022;24(1):201–6. Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Titova K.A., et al. Increasing protectivity of the smallpox vaccine. *Medical Immunology (Russia).* 2022;24(1):201–6. DOI: https://doi.org/10.15789/1563-0625-IPO-2203 EDN: https://elibrary.ru/asgrmi
42. Щелкунов С.Н., Якубицкий С.Н., Титова К.А. и др. Аттенуированный и высокоиммуногенный вариант вируса оспавакцины. *Acta Naturae.* 2024;16(2):82–9. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., et al. An attenuated and highly immunogenic variant of the vaccinia virus. *Acta Naturae.* 2024;16(2):82–9. DOI: https://doi.org/10.32607/actanaturae.27384 EDN: https://elibrary.ru/kcsbnp
43. Payne L.G., Kristensson K. Extracellular release of enveloped vaccinia virus from mouse nasal epithelial cells *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 1985;66(Pt. 3):643–6. DOI: https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-3-643
44. Kenner J., Cameron F., Empig C., et al. LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine.* 2006;24(47-48):7009–22. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.087
45. Gao J., Mese K., Bunz O., Ehrhardt A. State-of-the-art human adenovirus vectorology for therapeutic approaches. *FEBS Lett.* 2019;593(24):3609–22. DOI: https://doi.org/10.1002/1873-3468.13691
46. Hervouet C., Luci C., Bekri S., et al. Antigen-bearing dendritic cells from the sublingual mucosa recirculate to distant systemic lymphoid organs to prime mucosal CD8 T cells. *Mucosal Immunol.* 2014;7(2):280–91. DOI: https://doi.org/10.1038/mi.2013.45
47. Holmgren J., Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 2005;11(4 Suppl.):S45–53. DOI: https://doi.org/10.1038/nm1213
48. Wang Y., Yang K., Zhou H. Immunogenic proteins and potential delivery platforms for mpox virus vaccine development: a rapid review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;245:125515. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125515
49. Kaufman D.R., Goudsmit J., Holterman L., et al. Differential antigen requirements for protection against systemic and intranasal vaccinia virus challenges in mice. *J. Virol.* 2008;82(14):6829–37. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.00353-08
50. Agrawal S., Gupta S., Agrawal A. Vaccinia virus proteins activate human dendritic cells to induce T cell responses in vitro. *Vaccine.* 2009;27(1):88–92. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.031
51. Monath T.P., Caldwell J.R., Mundt W., et al. ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) — a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int. J. Infect. Dis.* 2004;8(Suppl. 2):S31–44. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.09.002

Информация об авторах

Зрелкин Денис Игоревич — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, aleza4striker@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0899-8357

Зубкова Ольга Вадимовна✉ — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olga-zubkova@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7893-8419

Ожаровская Татьяна Андреевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, t.ozh@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7147-1553

Попова Ольга — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olga.popova31@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3248-1227

Воронина Дарья Владимировна — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, daryavoronin2009@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6629-744X

Голдовская Полина Павловна — лаборант-исследователь лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, goldovskaya00@mail.ru, https://orcid.org/0009-0000-1965-0482

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

Information about the authors

Denis I. Zrelkin — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, aleza4striker@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0899-8357

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

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

Olga Popova — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, olga.popova31@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3248-1227

Daria V. Voronina — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, daryavoronin2009@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6629-744X

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Чугунова Анастасия Сергеевна — лаборант-исследователь лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, 170297_97@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-5964-6045

Должикова Инна Вадимовна — канд. биол. наук, зав. лаб. государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dolzhikova@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-2548-6142

Щербинин Дмитрий Николаевич — канд. биол. наук лаб. молекулярной биотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dim284@inbox.ru, https://orcid.org/0000-0002-8518-1669

Щебляков Дмитрий Викторович — канд. биол. наук, в. н. с., зав. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, sdmitriyv@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1289-3411

Логунов Денис Юрьевич — д-р биол. наук, академик РАН, зав. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, logunov@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-4035-6581

Гинцбург Александр Леонидович — д-р биол. наук, академик РАН, директор НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, gintsburg@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-1769-5059

Участие авторов: *Зрелкин Д.И.* — концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание статьи; *Зубкова О.В.* — руководство исследованием, участие в формулировании концепции и плана экспериментов, статистическая обработка данных, написание и научное редактирование статьи; *Ожаровская Т.А., Попова О.* — проведение исследований, получение генно-инженерных конструкций, написание и научное редактирование статьи; *Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Щербинин Д.Н.* — проведение экспериментов; *Должикова И.В.* — научное редактирование текста рукописи; *Щебляков Д.В.* — научное 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 03.01.2024;
принята к публикации 23.02.2025;
опубликована 28.02.2025

Polina P. Goldovskaya — laboratory assistant researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, goldovskaya00@mail.ru, https://orcid.org/0009-0000-1965-0482

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

Anastasia S. Chugunova — laboratory assistant researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, 170297_97@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-5964-6045

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

Dmitry N. Shcherbinin — Cand. Sci. (Biol.), Laboratory of molecular biotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, dim284@inbox.ru, https://orcid.org/0000-0002-8518-1669

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

Denis Y. Logunov — Dr. Sci. (Biol.), RAS academician, Head, Laboratory of cellular microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, logunov@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-4035-6581

Alexander L. Gintsburg — Dr. Sci. (Biol.), RAS Academician, Director, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, gintsburg@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-1769-5059

Authors' contribution: *Zrelkin D.I.* — concept and design of research, experimental work, collecting, analyzing and interpreting data, writing the article; *Zubkova O.V.* — supervision, participation in the formulation of the concept and plan of experiments, statistical data processing, writing and editing the article; *Ozharovskaia T.A., Popova O.* — research work, obtaining genetically engineered constructs, writing and editing the article; *Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Chugunova A.C., Shcherbinin D.N.* — experimental work; *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. 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 03.01.2024;
accepted for publication 23.02.2025;
published 28.02.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

CC BY

Адаптация вирусов гриппа H2N2 с различной рецепторной специфичностью к клеткам MDCK: возможности для разработки культуральной пандемической вакцины против гриппа H2N2

Матюшенко В.А.✉, Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Вирусы гриппа H2N2 вызвали пандемию в 1957 г. благодаря адаптации молекулы гемагглютинина от птичьего рецептора типа α2,3 к человеческому рецептору α2,6. Эти вирусы не циркулируют среди людей уже более 50 лет, но до сих пор встречаются в природном резервуаре, что указывает на их пандемический потенциал. Известно, что в начале пандемической волны вирусы с α2,3- и α2,6-рецепторной специфичностью могут циркулировать совместно и выбор того или иного изолята для разработки оптимальной пандемической гриппозной вакцины должен быть основан на убедительных научных данных. Хотя подавляющее большинство вакцин против гриппа производится с использованием развивающихся куриных эмбрионов, культура клеток млекопитающих может быть предпочтительным субстратом для производства вакцин против пандемического гриппа.

Материалы и методы. В настоящем исследовании мы изучили два варианта вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), которые отличались рецепторной специфичностью, определяемой 3 остатками в молекуле HA1: E156, Q226, G228 для α2,3 птичьего типа (Sing-α2,3) и K156, L226, S228 для α2,6 человеческого типа (Sing-α2,6) рецепторной специфичности, а также методами обратной генетики получили пару штаммов живой гриппозной вакцины H2N2 на основе донора аттенуации A/Ленинград/17 и диких вирусов A/Singapore/1/57 (H2N2) с α2,3- и α2,6-рецепторной специфичностью. Мы провели серийное пассирование этих вирусов на клетках MDCK и проанализировали ростовые свойства изолированных методом бляшек клонов *in vitro* и *in vivo*, а также их иммуногенность и перекрёстную реактивность в мышиной модели.

Результаты. Адаптация к клеткам MDCK значительно увеличивала титры вирусов в клетках MDCK, однако на их рецепторную специфичность это не влияло. Вирусы с α2,6-рецепторной специфичностью вызывали образование более высоких титров гомологичных антител по сравнению с вирусами со специфичностью к α2,3-рецепторам, но эти антитела могли реагировать только с вирусами α2,6. Напротив, антитела, индуцированные вирусами с α2,3-рецепторной специфичностью, обладали широкой реактивностью против всех изученных вирусов. Аналогичные результаты были получены для пары штаммов живой гриппозной вакцины H2N2 на основе донора аттенуации A/Ленинград/17 с α2,3- и α2,6-рецепторной специфичностью при их изучении на сирийских хомячках.

Заключение. В случае новой передачи вирусов птичьего гриппа H2N2 в человеческую популяцию и совместной циркуляции вирусов с обеими рецепторными специфичностями для создания кросс-реактивных гриппозных вакцин следует выбирать вариант с α2,3-специфичностью.

Ключевые слова: *вирус гриппа, H2N2, рецепторная специфичность, адаптация, культура клеток MDCK, живая гриппозная вакцина, иммуногенность*

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).

Благодарность. Авторы выражают благодарность всем сотрудникам отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины за помощь в проведении экспериментальных исследований, в особенности в. н. с. Екатерине Алексеевне Степановой, с. н. с. Екатерине Андреевне Баженовой, м. н. с. Полине Игоревне Прокопенко, с. н. с. Светлане Александровне Дониной.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки России FGWG-2025-0015.

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

Для цитирования: Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Адаптация вирусов гриппа H2N2 с различной рецепторной специфичностью к клеткам MDCK: возможности для разработки культуральной пандемической вакцины против гриппа H2N2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):31–42.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624
EDN: https://www.elibrary.ru/zffqga

© Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

Adaptation of H2N2 influenza viruses with different receptor specificity to MDCK cells: opportunities for the development of a cell-based vaccine against pandemic H2N2 influenza

Victoria A. Matyushenko✉, Arina D. Kostromitina, Larisa G. Rudenko, Irina N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. H2N2 influenza viruses caused a pandemic in 1957 due to the adaptation of avian influenza hemagglutinin from avian-type α2,3 to human-type α2,6 receptor specificity. These viruses have not circulated among humans for more than 50 years but are still found in avian reservoirs, indicating their pandemic potential. It is known that at the beginning of a pandemic wave, viruses with α2,3 and α2,6 receptor specificities can co-circulate, and the selection of one or another isolate for the development of a better pandemic influenza vaccine should be based on strong scientific evidence. Although the vast majority of influenza vaccines are produced in chicken embryos, mammalian cell culture may be a preferred substrate for the production of pandemic influenza vaccines.

Materials and methods. In this study, we investigated two variants of A/Singapore/1/57 (H2N2) virus which differed by their receptor specificity defined by three residues in the HA1 molecule: E156, Q226, G228 for α2,3 avian-type (Sing-α2,3) and K156, L226, S228 for α2,6 human-type (Sing-α2,6) receptor specificity. We conducted serial passaging of these viruses on MDCK cells and analyzed growth properties of plaque-purified clones *in vitro* and *in vivo*, as well as their immunogenicity and cross-reactivity in a mouse model.

Results. Adaptation to MDCK cells significantly increased viral titers in MDCK cells; however, their receptor specificity was not affected. Viruses with α2,6 receptor specificity induced higher titers of homologous antibodies compared to the viruses with α2,3 receptor specificity, but these antibodies could react only with the α2,6 viruses. In contrast, antibody induced by viruses with α2,3 receptor specificity had broad reactivity against all studied viruses. Similar results were obtained for the pair of A/Leningrad/17-based H2N2 live attenuated influenza vaccines with α2,3 and α2,6 receptor specificities in experiments on Syrian hamsters.

Conclusion. In the case of a new transmission of H2N2 avian influenza viruses to the human population and co-circulation of viruses with both receptor specificities, the variant with α2,3 specificity should be selected for the development of cross-reactive influenza vaccines.

Keywords: *influenza virus, H2N2, receptor specificity, adaptation, MDCK cells, live attenuated influenza vaccine, immunogenicity*

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).

Acknowledgement. The authors would like to thank all the staff of the Virology Department of the A.A. Smorodintsev Institute of Experimental Medicine for their help in conducting the experimental studies for their help in conducting experimental studies, especially leading researcher Ekaterina Alekseevna Stepanova, senior researcher Ekaterina Andreevna Bazhenova, junior researcher Polina Igorevna Prokopenko, senior researcher Svetlana Aleksandrovna Donina.

Funding source. The work was carried out within the framework of the FGWG-2025-0015 project of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

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

For citation: Matyushenko V.A., Kostromitina A.D., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Adaptation of H2N2 influenza viruses with different receptor specificity to MDCK cells: opportunities for the development of a cell-based vaccine against pandemic H2N2 influenza. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):31–42.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624
EDN: https://www.elibrary.ru/zffqga

Введение

Птичий грипп является зоонозной инфекцией, представляющей высокую опасность для человека ввиду высокой смертности, достигающей 60% при заражении высокопатогенными подтипами H5N1, H7N9, H5N6, H10N8 [1–4]. «Азиатский» грипп подтипа H2N2 появился в Сингапуре в феврале 1957 г. и стремительно вызвал пандемию, которая унесла более 2,7 млн жизней. Известно, что причиной пандемий гриппа H2N2 в 1957 г. и H3N2 в 1968 г. стало переключение рецепторной специфичности вируса с птичьего сиалового рецептора α2,3 на человече-

© Matyushenko V.A., Kostromitina A.D., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N., 2025

ский α2,6, при этом в начале пандемической волны одновременно циркулировали вирусы гриппа с обоими типами рецепторной специфичности [5, 6]. Поскольку птицы являются основным резервуаром и переносят практически все известные подтипы вируса гриппа А, в том числе H2N2, то риски возвращения данных вирусов в циркуляцию среди людей оцениваются как достаточно высокие [7]. Учитывая снижение популяционного иммунитета к вирусам H2N2 из-за их длительного отсутствия в циркуляции, учёные всего мира призывают начать кампании по вакцинации против этих вирусов заранее, не дожидаясь начала пандемии [8].

Как известно, вакцинопрофилактика гриппа является оптимальным методом борьбы против этой инфекции и существует множество гриппозных вакцин для сезонного применения. Однако в условиях пандемии наиболее эффективной считается живая гриппозная вакцина (ЖГВ) [9, 10]. Подавляющее большинство гриппозных вакцин в мире производится в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), но при этом в последние десятилетия активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, что позволит в короткие сроки нарабатывать большие объёмы вирусной биомассы, а также сузит список противопоказаний, в частности, позволит применять вакцину лицам, страдающим аллергией на куриный белок [11]. Кроме того, если пандемия гриппа будет вызвана высокопатогенным вирусом, то высока вероятность того, что поголовье кур на птицефабриках будет полностью уничтожено, поэтому независимость вакцинного производства от поставки яиц с птицефабрик также крайне важна. Таким образом, производство гриппозных вакцин целесообразно перевести на культуру клеток MDCK (культура клеток почки собаки породы Майдин–Дэрби), поскольку многочисленные исследования показывают, что именно в этой клеточной культуре вакцинные штаммы ЖГВ способны реплицироваться до титров, сопоставимых с РКЭ [12–14].

Основной **целью** настоящего исследования являлся поиск наиболее перспективного варианта вакцинного штамма культуральной ЖГВ A(H2N2), который следует использовать в начале пандемической волны. Для этого проводилось изучение двух вариантов пандемического вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), различающихся рецепторной специфичностью, и вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе. Была проведена адаптация вирусов к культуре клеток MDCK с последующим клонированием методом бляшек и оценкой рецепторной специфичности изолированных вариантов вирусов. Различающиеся по сиквенсу гена гемагглютинина (*HA*) варианты использовали для иммунизации лабораторных животных с целью выявления потенциального влияния адаптационных мутаций в поверхностных белках вируса на иммуногенность, антигенность и кросс-реактивность вырабатываемых после иммунизации антител.

Материалы и методы

Вирусы

В работе были использованы два варианта пандемического вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), полученные из коллекции отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, различавшиеся по чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови. Эксперименты с живыми вирусами H2N2 проводили в лаборатории с уровнем биобезопасности BSL-3.

Получение вакцинных штаммов ЖГВ методами обратной генетики

Гены *HA* и нейраминидазы (*NA*) клонировали в вектор для обратной генетики pCIPolISapIT с использованием универсальных пар праймеров, специфичных для каждого гена в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией [15]. Набор из 6 плазмидных ДНК с двунаправленным считыванием, кодирующих все сегменты донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), был подготовлен ранее [16]. Жизнеспособные вирусы гриппа получали при помощи электропорации клеток Vero с использованием системы трансфекции «Neon» («Invitrogen») и прилагающегося к нему набора «Neon Kit» 100 мкл.

Реакция гемагглютинации

Реакцию гемагглютинации (РГА) проводили по классической схеме с использованием куриных эритроцитов[1]. Для исследования рецепторной специфичности вирусов гриппа использовали модификацию РГА с ферментом экзосиалидазы exo-α-Sialidase (*Salmonella typhimurium*) («Megazyme»), который отщепляет с поверхности эритроцитов исключительно α2,3-рецепторы. Для постановки РГА использовали лошадиные эритроциты, которые на своей поверхности экспрессируют только α2,3-рецепторы; необработанные куриные эритроциты, которые экспрессируют оба типа рецепторов; куриные эритроциты, обработанные экзосиалидазой в течение 1 ч при 37ºС, т.е. несущие на своей поверхности только α2,6-рецепторы.

Считалось, что вирус обладал α2,3-рецепторной специфичностью, если его титр в РГА с лоша-

[1] WHO. Manual for the laboratory diagnosis of virological surveillance of influenza. Geneva;2011. URL: https://www.who.int/publications/i/item/manual-for-the-laboratory-diagnosis-and-virological-surveillance-of-influenza

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

диными и куриными эритроцитами совпадал и при этом титр в РГА с обработанными куриными эритроцитами был равен 0. В обратном случае считалось, что вирус обладал α2,6-рецепторной специфичностью. Если же во всех РГА титр был положительный, считалось, что вирус обладает двойственной рецепторной специфичностью с преимуществом того типа, где был больший титр в РГА.

Накопление вирусов и определение инфекционного титра

Для накопления вирусов гриппа в куриных эмбрионах 10–11-дневные РКЭ заражали вируссодержащим материалом в объёме 0,2 мл, после чего эмбрионы инкубировали в течение 48–72 ч при 33–37ºС. Накопление вирусов в культуре клеток MDCK проводили на суточном монослое с конфлюентностью 90–95%, выращенным в среде DMEM с добавлением 1×антибиотика-антимикотика («Gibco») и 10% фетальной бычьей сыворотки («Биолот») при 37ºС в термостате с содержанием 5% CO_2. Для заражения культуры клеток MDCK готовый монослой дважды отмывали тёплым раствором фосфатно-солевого буфера (PBS), после чего добавляли вирусную суспензию в объёме 1, 2, 3 мл во флаконы Т-25, Т-75 и Т-175 соответственно. После контакта в течение 1 ч при 33ºС для вакцинных штаммов и 37ºС для диких вирусов вируса гриппа в термостате с содержанием 5% CO_2 инокулят удаляли и добавляли среду DMEM с 1×антибиотиком-антимикотиком и 1 мкг/мл трипсина TPCK («Sigma-Aldrich Co.»). Через 72 ч инкубации при 33ºС или 37ºС визуально оценивали цитопатическое действие вируса и определяли его титр в РГА.

Инфекционные титры вирусов в обеих системах культивирования определяли методом предельных разведений. РКЭ заражали последовательными разведениями вирусов на PBS в объёме 200 мкл и инкубировали при 33ºС и 37ºС в течение 48 ч, после чего определяли наличие вируса в РГА с куриными эритроцитами. Определение титра в клетках MDCK проводили на 96-луночных планшетах с суточным монослоем, при этом серийные 10-кратные разведения готовили на среде DMEM с антибиотиком-антимикотиком и 1 мкг/мл трипсина TPCK. После адсорбции инокулят удаляли, клетки промывали и инкубировали в поддерживающей среде в течение 3 сут. Наличие вирусов в лунках определяли методом РГА с куриными эритроцитами. Титры вирусов в РКЭ и клетках MDCK рассчитывали по методу Рида и Менча [17] и выражали в 50% эмбриональной (lg $ЭИД_{50}$/мл) и тканевой цитопатогенной (lg $ТЦИД_{50}$/мл) инфекционных дозах.

Адаптация вирусов к культуре клеток MDCK

Адаптацию вирусов гриппа к культуре клеток MDCK проводили при последовательном 5-кратном пассировании штаммов, за которым следовало клонирование вируса методом бляшек. Для этого на 6-луночные планшеты, засеянные накануне клетками MDCK, наносили 10-кратные разведения вирусов в 2 повторах. После часового контакта с регулярным покачиванием инокулят удаляли и в лунки вносили по 3 мл агарозового покрытия, полученного смешиванием равных объёмов двукратной среды DMEM (в присутствии антибиотика-антимикотика и 2 мкг/мл трипсина TPCK) и 1,6% легкоплавкой агарозы («Lonza»). На 3–5-й день инкубации визуально оценивали вирусные бляшки, выделяли 20–30 хорошо отделяемых друг от друга бляшек на предельных разведениях, из каждой выделенной бляшки изолировали отдельный клон вируса, который затем накапливали на культуре клеток MDCK, и полностью секвенировали гены поверхностных белков методом Сэнгера с помощью набора «BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1» («Thermo»).

Эксперименты с лабораторными животными

В экспериментах с животными использовали мышей линии CBA и сирийских хомячков (Столбовая). Исследование было одобрено Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

Для оценки иммуногенности диких вирусов гриппа с различной рецепторной специфичностью были использованы самки мышей линии CBA, которых заражали интраназально в дозе 10^5 $ЭИД_{50}$/животное. Через 21 день животных эвтаназировали, после чего собирали сыворотки крови и смывы с верхних дыхательных путей (ВДП) для определения уровня гуморального иммунного ответа к различным вариантам вируса. Для оценки иммуногенности вакцинных штаммов ЖГВ H2N2 сирийских хомячков иммунизировали интраназально в дозе 10^5 lg $ЭИД_{50}$/животное, дважды с интервалом 21 день. На 21-й день после 2-й иммунизации животных эвтаназировали, собирали сыворотку крови, смывы с ВДП и бронхоальвеолярный лаваж.

Иммунологические методы

Исследование сывороток крови животных в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) проводили по стандартному протоколу[2] с куриными эритроцитами и обработкой сывороток рецептор-разрушающим ферментом («RDE», «Denka»). За титр сыворотки в РТГА принимали последнее разведение, при котором наблюдалось полное торможение гемагглютинации эритроцитов.

[2] WHO. Manual for the laboratory diagnosis of virological surveillance of influenza. Geneva;2011. URL: https://www.who.int/publications/i/item/manual-for-the-laboratory-diagnosis-and-virological-surveillance-of-influenza

Иммуноферментный анализ

Постановку иммуноферментного анализа (ИФА) с образцами от животных осуществляли с использованием в качестве антигена очищенных на градиенте плотности сахарозы вирусов гриппа. Антиген вносили в 96-луночные планшеты с высокой сорбцией («Corning») в количестве 16 АЕ в 50 мкл и инкубировали в течение ночи при 4ºС. Планшеты промывали 3 раза отмывочным буфером (PBS + 0,05% Twin-20 («Биолот»)), после чего проводили блокировку несвязанных сайтов с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина.

Двукратные разведения сывороток или смывов с дыхательных путей готовили в отдельных круглодонных планшетах, которые затем переносили в лунки отмытого от блокировочного раствора планшета. После инкубации в течение 1 ч при 37°С планшеты снова промывали 3 раза отмывочным буфером, подсушивали и вносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: анти-IgG мыши (1 : 10 000), анти-IgA мыши (1 : 2000), анти-IgG хомяка (1 : 5000) и анти-IgA хомяка (1 : 300). Инкубировали 1 ч при 37ºС, после чего 5 раз промывали планшет отмывочным буфером, подсушивали и добавляли 50 мкл/лунку субстрата TMB («Thermo»), который инкубировали в темноте до 20 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1М H_2SO_4. Первичные результаты ИФА учитывали на спектрофотометре («Bio-Rad») при длине волны 450 нм. За титр антител принимали последнее разведение, при котором оптическая плотность (ОП) превышала двукратный средний уровень контрольных лунок. Рассчитывали площадь под кривой ОП с помощью программного пакета «GraphPad Prizm 7».

Статистическая обработка данных

Для сравнения данных использовали непараметрический U-test Манна–Уитни; t-критерий Стьюдента и ANOVA с помощью программного обеспечения «GraphPad Prizm 7». Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Два варианта пандемического штамма A/Singapore/1/57 (H2N2) были восстановлены из ампул с материалом, лиофилизированным в 1975 г., при этом точная пассажная история вирусов неизвестна. Накопленные в РКЭ вирусы различались по уровню чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови морской свинки. Полногеномное секвенирование показало, что у этих вирусов в субъединице HA1 присутствуют аминокислотные отличия в позициях 156 (E/K), 226 (Q/L) и 228 (G/S) (**таблица**). По данным литературы, замены в позициях 226 и 228 отвечают за рецепторную специфичность вируса гриппа [5, 6]. Действительно, оценка сродства этих вирусов к рецепторам на поверхности эритроцитов в РГА с различными типами эритроцитов показала, что вирус с остатками E156, Q226 и G228 обладает α2,3-рецепторной специфичностью (обозначен как Sing-α2,3), а вариант с остатками K156, L226 и S228 имеет сродство к α2,6-рецепторам (Sing-α2,6) (**рис. 1**, *а*). Аминокислотная замена *K19T* была обнаружена в молекуле NA, но поскольку она находится в трансмембранном домене, то влияния на рецепторную специфичность не имеет (таблица). Адаптация исследуемых вирусов к культуре клеток MDCK и последующее клонирование бляшками позволило выделить 3 дополнительных варианта вирусов с отличающимися последовательностями HA: Sing-α2,6-EP с мутациями *G158E* и *L321P* в субъединице HA1, Sing-α2,3-S с мутацией *P221S* в субъединице HA1 и Sing-α2,3-V с мутацией *A96V* в субъединице HA2 (таблица).

Изучение MDCK-адаптированных вариантов в РГА показало, что штамм Sing-α2,6-EP имеет сродство к α2,6-рецепторам, а варианты Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V — к α2,3-рецепторам (рис. 1, *а*). Таким

Аминокислотные различия в поверхностных белках исследуемых вариантов вируса A/Singapore/1/57 (H2N2)
Amino acid substitutions in surface proteins of investigated variants of A/Singapore/1/57 (H2N2) virus

Вирус Virus	HA							NA
	HA1						HA2	
	156	158	221	226	228	321	96	19
Исходные штаммы, накопленные в РКЭ | Original strains accumulated in the Egg								
Sing-α2,6	Lys	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr
Sing-α2,3	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Ala	Lys
MDCK-адаптированные штаммы | MDCK-adapted strains								
Sing-α2,6-EP	Lys	Glu	Pro	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr
Sing-α2,3-S	Glu	Gly	Ser	Gln	Gly	Leu	Ala	Lys
Sing-α2,3-V	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Val	Lys

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

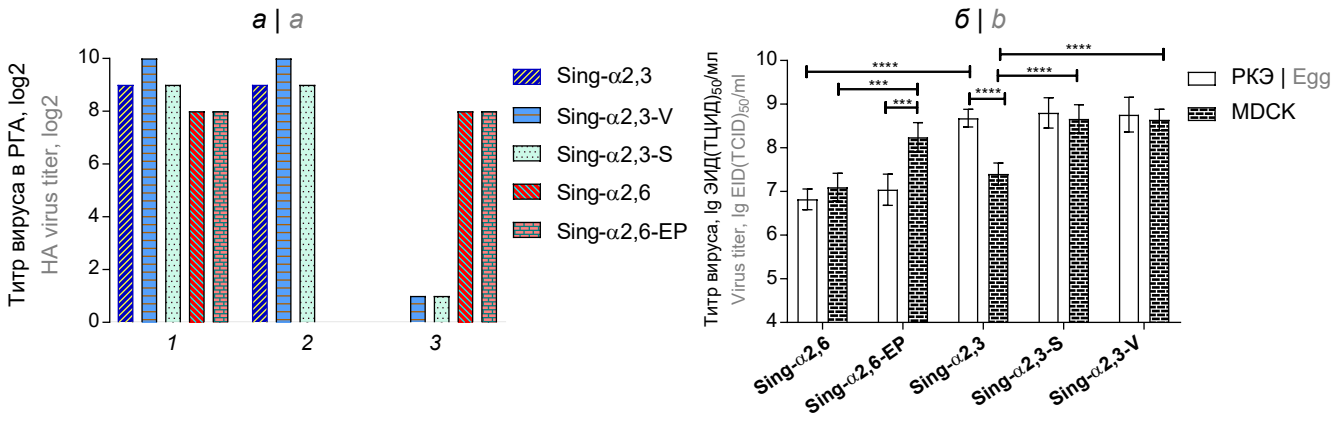


Рис. 1. Характеристика исследуемых вирусов *in vitro*.

а — титры вирусов в РГА с необработанными куриными эритроцитами (*1*), лошадиными эритроцитами (*2*) и куриными эритроцитами, обработанными экзосиалидазой (*3*); *б* — инфекционная активность исследуемых вирусов в системе РКЭ и культуре клеток MDCK.

Fig. 1. Characterization of the studied viruses *in vitro*.

a — titers of viruses in HA with untreated chicken erythrocytes (*1*), horse erythrocytes (*2*) and chicken erythrocytes treated with exosialidase (*3*); *b* — infectious activity of the studied viruses in the Egg and MDCK cells.

образом, адаптация «диких» вирусов гриппа H2N2 к культуре клеток млекопитающих не оказывает существенного влияния на их рецепторную специфичность.

Кроме этого, была исследована инфекционная активность всех вирусов в РКЭ и культуре клеток MDCK. Установлено, что вирус Sing-α2,3 в среднем на 2 порядка лучше размножался в системе РКЭ, чем вирус Sing-α2,6, при этом их титры в культуре клеток MDCK были сопоставимы (рис. 1, *б*). Важно отметить, что инфекционная активность MDCK-адаптированных вариантов в культуре клеток была значительно выше, чем у соответствующих исходных вирусов. Таким образом, отмечен вклад мутаций *G158E* и *L321P*, *P221S* в субъединице HA1 и *A96V* в субъединице HA2 в увеличение инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK (рис. 1, *б*).

Иммунизация мышей линии CBA исходными штаммами Sing-α2,6 и Sing-α2,3, а также MDCK-адаптированными вариантами приводила к образованию более высоких уровней гомологичных сывороточных антител у вирусов Sing-α2,6 и Sing-α2,6-EP по сравнению с вирусами, имеющими сродство к α2,3-рецепторам (**рис. 2**, *а*, *б*). При этом адаптированные к клеткам варианты Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V индуцировали значительно меньшие уровни гомологичных сывороточных IgG-антител по сравнению с исходным вариантом Sing-α2,3 (рис. 2, *б*). Исследование местного гуморального иммунного ответа показало существенные приросты секреторных IgA-антител у всех 5 исследуемых вирусов: Sing-α2,6, Sing-α2,6-EP, Sing-α2,3, Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V (рис. 2, *в*). Сравнение уровней IgA-антител в группах исходных вирусов Sing-α2,6 и Sing-α2,3 различий не выявило (p = 0,3355), что отличается от данных по системному гуморальному ответу. Тем не менее сравнительный анализ уровней секреторных IgA-антител между группами вирусов, заражённых MDCK-адаптированными вариантами Sing-α2,6-EP, Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V, как и в системном ответе, выявил превосходство вируса Sing-α2,6-EP. Суммируя данные об индукции системного и локального иммунного ответа исследуемыми вирусами, можно заключить, что все указанные вирусы индуцируют гуморальный ответ, однако наименее иммуногенны оказались MDCK-адаптированные варианты с рецепторной специфичностью α2,3 (Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V) на уровне как системного, так и локального гуморального иммунитета. Наоборот, вирусы Sing-α2,6, Sing-α2,6-EP с рецепторной специфичностью α2,6 не отличались по иммуногенности ни в одном из тестов.

Далее была проведена оценка кросс-реактивности сывороточных антител, выработанных при введении 5 исследованных вариантов вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), в отношении каждого варианта в РТГА и ИФА. Интересно, что при использовании в качестве антигенов в РТГА вирусов с α2-6-рецепторной специфичностью выявлялись существенно более высокие показатели титров антител во всех иммунизированных группах, по сравнению с антигенами, обладающими α2-3-специфичностью (**рис. 3**, *а*). При этом антитела в сыворотках группы Sing-α2,6 не уловили ни один из 3 вариантов вирусов с α2-3-рецепторной специфичностью. Несмотря на то что у мышей, иммунизированных MDCK-адаптированным вариантом Sing-α2,6-EP, выявлялись титры антител выше уровня детекции, статистически значимых отличий с группой контроля не обнаружено. Исследование кросс-реактивности сывороточных IgG-антител методом ИФА показало схожие результаты: вирусы с α2-6-рецепторной специфичностью в качестве антигенов выявляли наиболее высокие значения титров антител во всех

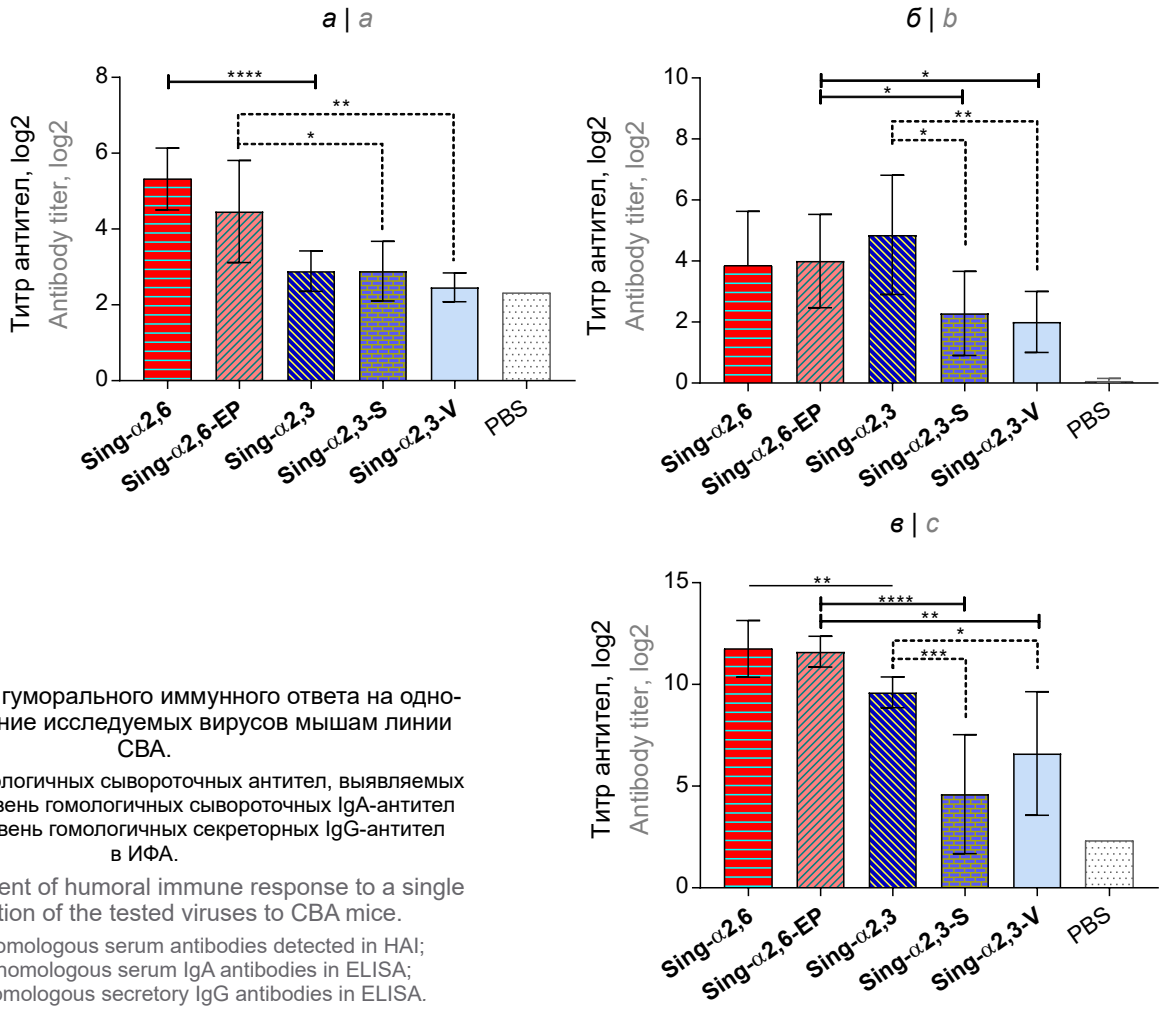


Рис. 2. Оценка гуморального иммунного ответа на однократное введение исследуемых вирусов мышам линии СВА.

а — уровень гомологичных сывороточных антител, выявляемых в РТГА; *б* — уровень гомологичных сывороточных IgA-антител в ИФА; *в* — уровень гомологичных секреторных IgG-антител в ИФА.

Fig. 2. Assessment of humoral immune response to a single administration of the tested viruses to CBA mice.

a — level of homologous serum antibodies detected in HAI; *b* — level of homologous serum IgA antibodies in ELISA; *c* — level of homologous secretory IgG antibodies in ELISA.

группах, тогда как связывание антител с вирусами с α2,3-рецепторной специфичностью было значительно слабее у животных всех групп (рис. 3, *б*).

Важно отметить, что вирусы с α2-6-рецепторной специфичностью в качестве антигена одинаково хорошо связывали антитела в сыворотках мышей из всех исследуемых групп, за исключением группы животных, иммунизированных вирусом Sing-α2,3-V, в которой титры антител к вирусам Sing-α2,6 и Sing-α2,6-EP достоверно отличались от титров антител в других группах (рис. 3, *а*). В группах животных, иммунизированных MDCK-адаптированными вариантами с α2-3-рецепторной специфичностью, наблюдалась обратная ситуация: титры IgG-антител к вирусам Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V во всех иммунизированных группах были снижены; при этом замену *P221S* в субъединице HA1 можно охарактеризовать как escape-мутацию, поскольку вирус Sing-α2,3-S наиболее эффективно уходит от распознавания антителами у всех исследованных вариантов иммуногенов (рис. 3, *б*).

В целом полученные результаты указывают на то, что для производства клеточной пандемической вакцины H2N2 наиболее подходящими вирусами являются варианты с α2-3-рецепторной специфичностью, адаптированные к культуре клеток MDCK или выделенные на ней.

Для подтверждения этой гипотезы мы сконструировали методами обратной генетики 2 штамма живой гриппозной вакцины H2N2 на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57: A/17/Singapore/57/1 с генами *HA* и *NA* от вируса Sing-α2,3 (обозначен как 17/Sing-α2,3) и A/17/Singapore/57/2 с генами *HA* и *NA* от вируса Sing-α2,6 (17/Sing-α2,6). РГА с различными эритроцитами подтвердило рецепторную специфичность полученных вакцинных вирусов, которая совпадала с соответствующим диким вирусом (**рис. 4**, *а*), что ещё раз указывает на ключевую роль HA в связывании с гликановыми рецепторами клетки-хозяина. Важно отметить, что адаптация вакцинных штаммов к клеткам MDCK не привела к появлению новых мутаций в молекуле HA: более 50 накопленных из бляшек вирусов соответствовали исходному штамму ЖГВ. Оценка инфекционной активности сконструированных вирусов показала, что вакцинные штаммы 17/Sing-α2,3 и 17/Sing-α2,6 одинаково хорошо размножались в культуре клеток MDCK,

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

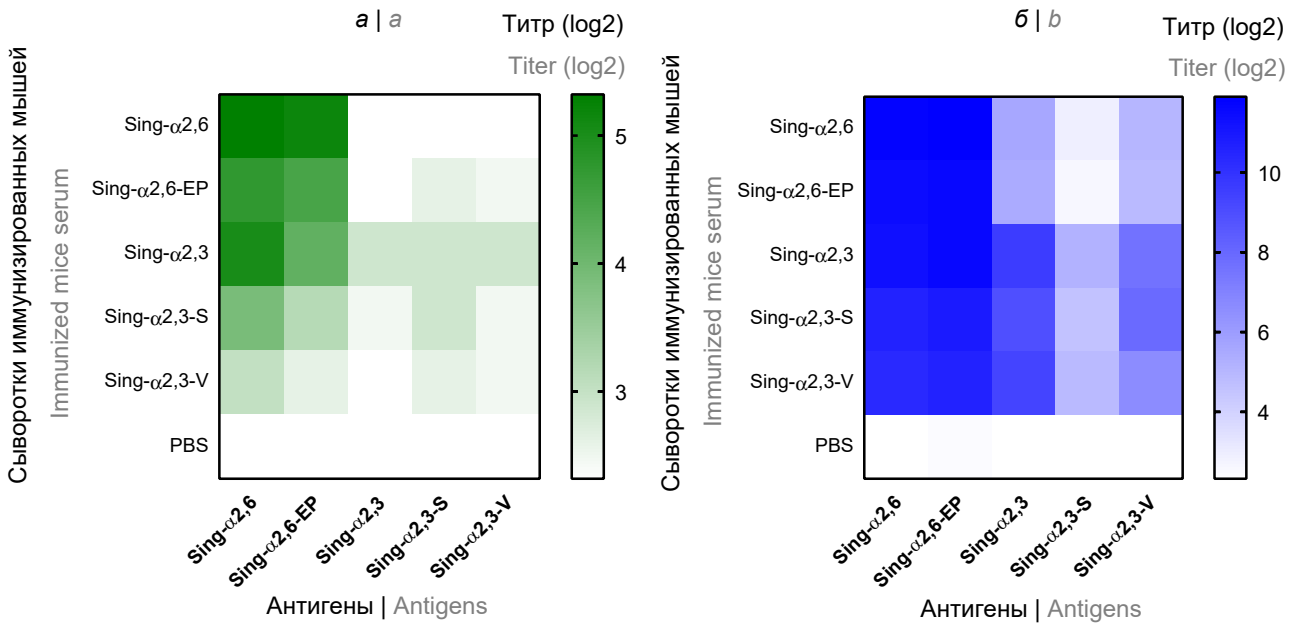


Рис. 3. «Тепловая карта» иммуногенности и кросс-реактивности исследуемых вариантов вируса A/Singapore/1/57 (H2N2) в эксперименте на мышах (*n* = 7).

а — средние значения уровней антигемагглютинирующих антител у всех иммунизированных групп в отношении различных вирусных антигенов; *б* — средние значения уровней сывороточных IgG-антител у всех иммунизированных групп в отношении различных вирусных антигенов.

Fig. 3. Heat map of the immunogenicity and cross-reactivity of investigated variants of A/Singapore/1/57 (H2N2) virus in the experiment on mice (*n* = 7).

a — mean values of the levels of anti-hemagglutinating antibodies in all immunized groups against different viral antigens; *b* — mean values of the levels of serum IgG antibodies in all immunized groups against different viral antigens.

тогда как в РКЭ вирус 17/Sing-α2,3 имел инфекционный титр на порядок выше, чем у вируса 17/Sing-α2,6 (рис. 4, *б*).

Двукратная иммунизация сирийских хомячков генно-инженерными вакцинными штаммами 17/Sing-α2,3 и 17/Sing-α2,6 приводила к формированию у животных схожих уровней сывороточных IgG-антител, связывающихся с антигеном Sing-α2,3, при этом вакцинный вирус 17/Sing-α2,3 индуцировал достоверно больше антител к антигену Sing-α2,6, чем к собственному антигену Sing-α2,3 (**рис. 5**). Полученные результаты полностью согласуются с результатами изучения антигенности пандемических вариантов A/Singapore/1/57 в эксперименте на мышах (рис. 3).

Проведено исследование кросс-реактивности локальных IgA-антител в смывах с ВДП и нижних дыхательных путей в ИФА с теми же вирусны-

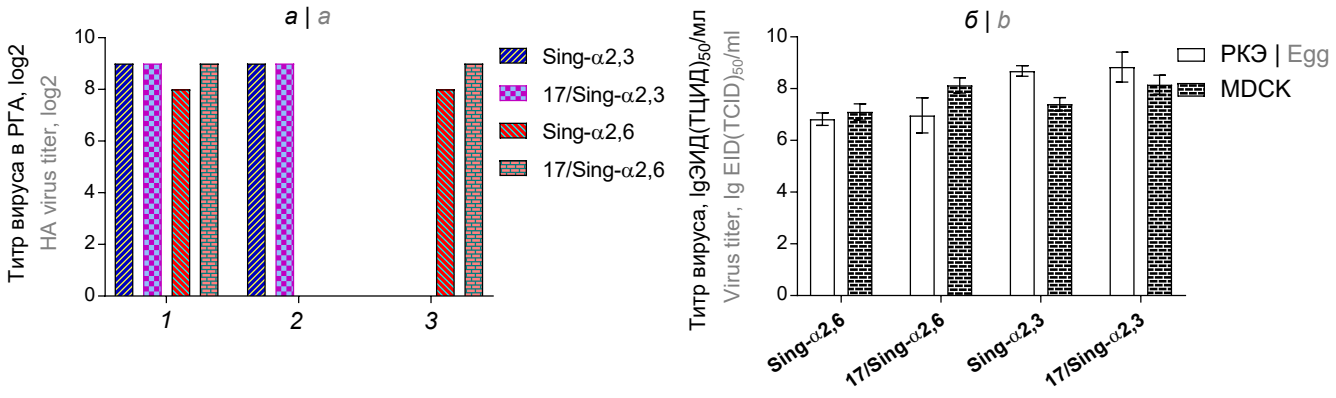


Рис. 4. Характеристика исследуемых вакцинных штаммов ЖГВ H2N2 *in vitro*.

а — титры вирусов в РГА с необработанными куриными эритроцитами (*1*), лошадиными эритроцитами (*2*), куриными эритроцитами, обработанными экзосиалидазой (*3*); *б* — инфекционная активность исследуемых вирусов в системе РКЭ и культуре клеток MDCK.

Fig. 4. Characterization of the investigated vaccine strains of H2N2 LIV *in vitro*.

a — virus titers in HA assays with untreated chicken erythrocytes (*1*), horse erythrocytes (*2*), chicken erythrocytes treated with exosialidase (3); *b* — infectious activity of the studied viruses in the Egg system and MDCK cell culture.

ми антигенами. Использование вируса Sing-α2,6 в качестве антигена позволило выявить существенно более высокие уровни секреторных вирусспецифических антител по сравнению с использованием в качестве антигена вируса Sing-α2,3 (рис. 5).

Таким образом, из представленных результатов следует, что вирусы гриппа подтипа H2N2 с α2-3-рецепторной специфичностью индуцируют антитела, обладающие более широкой кросс-реактивностью в отношении вирусов с различной рецепторной специфичностью, по сравнению с антителами, образованными при введении вирусов, имеющих сродство к α2-6-рецепторам. Данный феномен необходимо учитывать при выборе штамма для подготовки вакцины в случае наступления пандемии гриппа H2N2.

Обсуждение

Вирусы гриппа A(H2N2) циркулировали в человеческой популяции с 1957 по 1968 г., после чего они были вытеснены вирусами A(H3N2), вызвавшими пандемию «гонконгского» гриппа [18]. Поскольку вирусы H2N2 не инфицируют людей уже более 50 лет, можно говорить о чрезвычайно низком уровне популяционного иммунитета к данным вирусам, и люди, рождённые после 1968 г., являются наиболее уязвимой группой в случае возвращения вирусов H2N2 в циркуляцию [19]. Учитывая сохранность вирусов гриппа с гемагглютинином H2 в природном резервуаре [20–22], вероятность наступления новой пандемии гриппа H2N2 оценивается как высокая [7]. В этой связи исследования, направленные на разработку и детальное изучение потенциально пандемических вакцин против вирусов данного подтипа, чрезвычайно важны и актуальны.

Ранее нами была разработана и изучена в доклинических и клинических исследованиях ЖГВ против вируса H2N2, циркулировавшего в конце пандемической волны, — A/Калифорния/1/66 (H2N2) [23, 24], и данная вакцина может быть использована для иммунизации наиболее уязвимых групп населения в случае возвращения в циркуляцию антигенно схожих вирусов H2N2. Однако результаты мониторинга за вирусами гриппа птиц показывают, что большинство изолятов подтипа H2N2 остаются антигенно сходными с пандемическим вирусом A/Singapore/1/57 и сохраняют предпочтение к сиаловым α2,3-рецепторам птичьего типа [7]. Детальные исследования влияния рецепторной специфичности вирусов на их трансмиссивность в экспериментах на хорьках показали, что при переключении рецептора с α2,3- на α2,6-тип существенно повышается способность вируса передаваться воздушно-капельным путём, что может сыграть решающую роль в пандемическом распространении вирусов H2N2 [25]. Тем не менее в литературе отсутствуют чёткие данные о том, какие именно вирусы лучше использовать для подготовки вакцин в начале пандемии, вызванной вирусами гриппа птиц и обладающих сродством к обоим типам клеточных рецепторов.

В настоящей работе мы провели модельный эксперимент с пандемическими вариантами вируса A/Singapore/1/57, социркулировавшими в 1957 г. и отличающимися рецепторной специфичностью молекулы HA, которая определялась 3 аминокислотными отличиями в субъединице HA1: E156, Q226, G228 — у варианта Sing-α2,3 и K156, L226, S228 — у варианта Sing-α2,6. Поскольку пандемические вакцины целесообразно производить на перевиваемых клеточных линиях для повышения качества продукта и возможности ускоренного масштабирования производства [11, 26], мы проводили серийное пассирование как исходных пандемических вирусов Sing-α2,3 и Sing-α2,6, так и реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе, в культуре клеток MDCK с последующей идентификацией новых замен в молекуле HA. Интересно, что адаптационные мутации возникали при пассажах только пандемических вирусов в клетках, но не вакцинных штаммов ЖГВ. Это может быть связано с тем, что пандемические варианты представляли собой гетерогенную популяцию вирусов с неизвестной пассажной историей, тогда как вакцинные вирусы прошли только два пассажа в РКЭ после сборки из плазмид и представляли собой более гомогенную популяцию. Важно отметить, что обнаруженные нами мутации не повлияли на рецепторную специфичность вирусов, но оказывали влияние на их антигенность. В частности, мутация *P221S* в субъединице HA1 носила характер escape-мутации, поскольку позволяла избегать распознавания антителами в сыворотках животных, иммунизированных всеми исследованными вариантами A/Singapore/1/57. Интересно, что аналогичная мутация была описана для вирусов гриппа птиц подтипа H9N2, при этом она снижала сродство вируса к аналогу птичьего α2,3-рецептора, но в комбинации с мутацией *L226Q* сродство к данному рецептору восстанавливалось [27], что полностью совпадает с нашими результатами. Кроме того, мутация *P221S* обнаруживалась у вируса A/Wyoming/3/2003 (H3N2) при его серийном пассировании в клетках MDCK [28], что также подтверждает адаптационный характер данной замены.

Заключение

Наиболее важным результатом исследования является демонстрация более широкой кросс-реактивности антител, вырабатываемых при интраназальной иммунизации животных вирусами H2N2 с α2,3-рецепторной специфичностью. Причём это было показано как для пандемических вирусов A/Singapore/1/57, так и для вакцинных реассортант-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624
ORIGINAL RESEARCHES

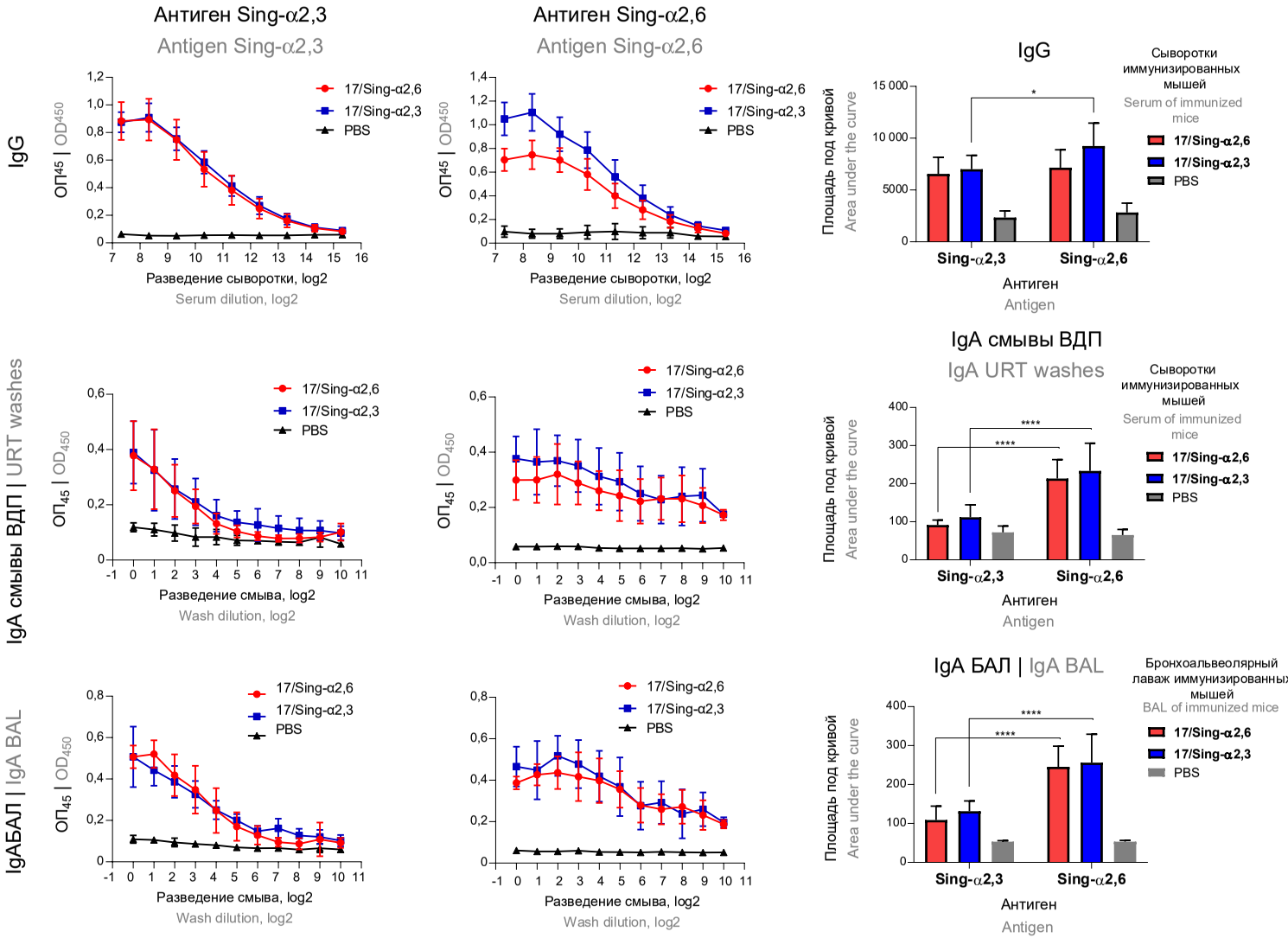


Рис. 5. Оценка гуморального иммунного ответа на двукратное введение исследуемых вакцинных штаммов ЖГВ сирийским хомячкам.

Слева представлены значения $ОП_{450}$ при различных разведениях сывороток или смывов с ВДП и бронхоальвеолярного лаважа к вирусу Sing-α2,3 в ИФА. Посередине представлены значения $ОП_{450}$ при различных разведениях сывороток или смывов к вирусу Sing-α2,6 в ИФА. Справа — значения площади под кривой ОП при длине волны 450 нм в ИФА с соответствующим антигеном.

Fig. 5. Evaluation of the humoral immune response to twice-daily administration of the tested vaccine strains of LIV to Syrian hamsters.

On the left are OD_{450} values at different dilutions of sera or washes from URT and bronchoalveolar lavage to Sing-α2,3 virus in ELISA. In the middle are OD_{450} values at different dilutions of sera or washes to Sing-α2,6 virus in ELISA. On the right are the area under the optical density curve at 450 nm in ELISA with the corresponding antigen.

ных штаммов ЖГВ, полученных методами обратной генетики. Тут важно отметить, что вакцинный штамм ЖГВ 17/Sing-α2,3 подходит для производства на культуре клеток, поскольку достигает высокого инфекционного титра в культуре клеток MDCK, а гомогенная природа штамма за счёт его подготовки генно-инженерными методами обеспечит генетическую стабильность вакцины при серийных пассажах на клетках MDCK, что говорит в пользу массовой наработки вакцины в первую волну пандемии. Кроме того, такой выбор штамма для производства пандемической клеточной ЖГВ позволит максимально увеличить репродукцию вакцинного штамма в культуре клеток MDCK, а также обеспечит высокую эффективность вакцины благодаря полноценному антигенному охвату циркулирующих вирусов гриппа в случае пандемии.

Несмотря на то что выдвинутая нами гипотеза нашла экспериментальное подтверждение на различных животных моделях, для потенциального широкого применения штамма ЖГВ 17/Sing-α2,3 среди людей требуется изучение его иммуногенности и кросс-реактивности в клинических испытаниях. Одним из препятствий к использованию штамма ЖГВ 17/Sing-α2,3 в клинической практике может служить потенциально сниженная репликативная активность вируса в ВДП людей, поскольку у людей α2,3-рецепторы слабо представлены в ВДП и преимущественно экспрессируются в нижних отделах респираторного тракта [29], где вакцинный вирус не размножается в силу своего температурно-чувствительного фенотипа, и это может привести к низкой иммуногенности ЖГВ. Однако опыт иммунизации людей ЖГВ против птичьего гриппа H5N1, возбудитель которого также имеет α2,3-рецепторную специфичность, показал, что даже в отсутствие репликации в ВДП и при низких уровнях сывороточных антител к вирусу после интраназальной иммунизации ЖГВ формирует долгоживущий иммунный ответ, который может быть демаскирован путём введения инактивированной гриппозной вакцины несколько месяцев и даже лет спустя [30, 31]. Соответственно, стратегия гетерологичной прайм-буст-иммунизации в начале пандемии гриппа H2N2 также может рассматриваться как наиболее перспективная для формирования мощного долгоживущего гуморального иммунитета с широким спектром защиты.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Charostad J., Rezaei Zadeh Rukerd M., Mahmoudvand S., et al. A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep. *Travel Med. Infect. Dis.* 2023;55:102638. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2023.102638
2. Tanner W.D., Toth D.J., Gundlapalli A.V. The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review. *Epidemiol. Infect.* 2015;143(16):3359–74. DOI: https://doi.org/10.1017/s0950268815001570
3. Chen H., Yuan H., Gao R., et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet*. 2014;383(9918):714–21. DOI: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60111-2
4. Yang Z.F., Mok C.K., Peiris J.S., Zhong N.S. Human infection with a novel avian influenza A(H5N6) virus. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(5):487–9. DOI: https://doi.org/10.1056/nejmc1502983
5. Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. 1994;205(1):17–23. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.1994.1615
6. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000;74(18):8502–12. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000
7. Jones J.C., Baranovich T., Marathe B.M., et al. Risk assessment of H2N2 influenza viruses from the avian reservoir. *J. Virol.* 2014;88(2):1175–88. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.02526-13
8. Nabel G.J., Wei C.J., Ledgerwood J.E. Vaccinate for the next H2N2 pandemic now. *Nature*. 2011;471(7337):157–8. DOI: https://doi.org/10.1038/471157a
9. Rudenko L., Isakova-Sivak I. Pandemic preparedness with live attenuated influenza vaccines based on A/Leningrad/134/17/57 master donor virus. *Expert Rev. Vaccines.* 2015;14(3):395–412. DOI: https://doi.org/10.1586/14760584.2015.979159
10. Chen G.L., Subbarao K. Live attenuated vaccines for pandemic influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009;333:109–32. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3_5
11. Hegde N.R. Cell culture-based influenza vaccines: a necessary and indispensable investment for the future. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015;11(5):1223–34. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1016666
12. Hussain A.I., Cordeiro M., Sevilla E., Liu J. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: *in vitro* cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. *Vaccine.* 2010;28(22):3848–55. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.005
13. Liu J., Shi X., Schwartz R., Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine*. 2009;27(46):6460–3. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.024
14. Киселева И.В., Исакова И.Н., Ларионова Н.В. и др. Эффективность получения реассортантов между эпидемическими и холодоадаптированнымн вирусами гриппа в развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2007; 84(6):40–5. Kiseleva I.V., Isakova I.N., Larionova N.V., et al. Efficacy of production of reassortants between epidemic and cold-adapted influenza viruses in growing chicken embryos and in MDCK cell culture. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;84(6):40–5. EDN: https://elibrary.ru/iisqbx
15. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000;97(11):6108–13. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.100133697
16. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*. 2011;412(2):297–305. DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.004
17. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27(3):493–7.

18. Kilbourne E.D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12(1):9–14. DOI: https://doi.org/10.3201/eid1201.051254
19. Babu T.M., Perera R.A.P.M., Wu J.T., et al. Population serologic immunity to human and avian H2N2 viruses in the United States and Hong Kong for pandemic risk assessment. *J. Infect. Dis.* 2018;218(7):1054–60. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiy291
20. Ma W., Vincent A.L., Gramer M.R., et al. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007;104(52):20949–54. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0710286104
21. Schäfer J., Khristova M.L., Busse T.L., et al. Analysis of internal proteins of influenza A (H2N2) viruses isolated from birds in East Germany in 1983. *Acta Virol.* 1992;36(2):113–20.
22. Makarova N.V., Kaverin N.V., Krauss S., et al. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. *J. Gen. Virol.* 1999;80(Pt. 12):3167–71. DOI: https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-12-3167
23. Isakova-Sivak I., de Jonge J., Smolonogina T., et al. Development and pre-clinical evaluation of two LAIV strains against potentially pandemic H2N2 influenza virus. *PloS One*. 2014;9(7):e102339. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102339
24. Isakova-Sivak I., Stukova M., Erofeeva M., et al. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015;11(4):970–82. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1010859
25. Pappas C., Viswanathan K., Chandrasekaran A., et al. Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957. *PloS One*. 2010;5(6):e11158. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011158
26. Genzel Y., Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2009;8(12): 1681–92. DOI: https://doi.org/10.1586/erv.09.128
27. An S.H., Son S.E., Song J.H., et al. Selection of an optimal recombinant Egyptian H9N2 avian influenza vaccine strain for poultry with high antigenicity and safety. *Vaccines (Basel).* 2022;10(2):162. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines10020162
28. Barnard K.N., Wasik B.R., Alford B.K., et al. Sequence dynamics of three influenza A virus strains grown in different MDCK cell lines, including those expressing different sialic acid receptors. *J. Evol. Biol.* 2021;34(12):1878–900. DOI: https://doi.org/10.1111/jeb.13890
29. de Graaf M., Fouchier R.A. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* 2014;33(8):823–41. DOI: https://doi.org/10.1002/embj.201387442
30. Rudenko L., Naykhin A., Donina S., et al. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(12): 2839–48. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1069931
31. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S., et al. A live attenuated influenza A(H5N1) vaccine induces long-term immunity in the absence of a primary antibody response. *J. Infect. Dis.* 2014;209(12):1860–9. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiu123

Информация об авторах

Матюшенко Виктория Аркадьевна✉ — н. с. лаб. иммунологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, matyshenko@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-4698-6085

Костромитина Арина Дмитриевна — м. н. с. лаб. клеточной иммунологии отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, arina8goshina@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5432-0171

Руденко Лариса Георгиевна — д-р мед. наук, профессор, рук. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, vaccine@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0107-9959

Исакова-Сивак Ирина Николаевна — д-р биол. наук, член-корр. РАН, зав. лаб. иммунологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, isakova.sivak@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-2801-1508

Участие авторов: *Матюшенко В.А.* — идея и разработка концепции статьи, подготовка и проведение вирусологических и иммунологических исследований, анализ данных мировой литературы, подготовка текста статьи; *Костромитина А.Д.* — подготовка и проведение иммунологических исследований вакцинных препаратов; *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, научное редактирование статьи, окончательное утверждение версии для публикации.

Статья поступила в редакцию 20.10.2024;
принята к публикации 28.12.2024;
опубликована 28.02.2025

Information about the authors

Victoria A. Matyushenko✉ — researcher, Laboratory of immunology and vaccine prevention of viral infections, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, matyshenko@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-4698-6085

Arina D. Kostromitina — junior researcher, Laboratory of cellular immunology, Department of immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, arina8goshina@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5432-0171

Larisa G. Rudenko — MD, PhD, Professor, Head of the Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, vaccine@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0107-9959

Irina N. Isakova-Sivak — Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of immunology and vaccine prevention of viral infections, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, isakova.sivak@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-2801-1508

Authors' contribution: *Matyushenko V.A.* — idea and development of the article concept, preparation and implementation of virological and immunological studies, analysis of world literature data, preparation of the article text; *Kostromitina A.D.* — preparation and implementation of immunological studies of vaccine preparations; *Rudenko L.G.* — idea and development of the article concept, writing the article text, final approval of the version for publication; *Isakova-Sivak I.N.* — idea and development of the article concept, general management of the project, writing the article, scientific editing of the article, final approval of the version for publication.

The article was submitted 20.10.2024;
accepted for publication 28.12.2024;
published 28.02.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

CC BY

Распространённость, спектр и взаимосвязи краткосрочных и долгосрочных последствий COVID-19 у детей

Мескина Е.Р.✉, Хадисова М.К., Ушакова А.Ю., Целипанова Е.Е., Галкина Л.А.

Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Данные о распространённости состояния после COVID-19 (Post-COVID-19 condition, PCC) у детей различаются из-за отсутствия конкретных диагностических критериев, надёжных биомаркеров и ограничений многих проведённых исследований. Важно изучить связь между PCC, функциональными расстройствами в прошлом и любыми событиями после перенесённого COVID-19, чтобы оценить истинное бремя PCC у детей.

Цель — определение распространённости PCC во взаимосвязи с исходными функциональными расстройствами у детей в течение года после нетяжёлой формы COVID-19 и острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) другой этиологии.

Материалы и методы. В проспективное исследование методом сплошной выборки включены дети младше 18 лет, госпитализированные в больницу с подозрением на COVID-19, у которых COVID-19 был подтверждён в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (n = 121) или исключён молекулярным и серологическим методами (группа ОРВИ; n = 105). Информация о пациентах собрана с сентября 2020 г. по декабрь 2021 г. путём анкетирования в индексных точках: при выписке из больницы и через 1, 3, 6 и 12 мес. Тяжёлые формы COVID-19 и пациенты с хроническими заболеваниями были исключены. Учитывали функциональные расстройства в анамнезе и любые события, связанные с нарушением здоровья, в течение года наблюдения, выраженность симптомов. Анализ проведён в группах детей < 6 лет и ≥ 6 лет. Симптомы были сгруппированы в кластеры.

Результаты. Симптомы определены с частотой 32% у детей < 6 лет и 39% у детей ≥ 6 лет. Наиболее распространёнными были психоэмоциональный, респираторный кластеры и синдром вегетативных дисфункций (СВД). Симптомы в большинстве случаев были лёгкими с продолжительностью 3–6 мес. После поправки на возраст, СВД в анамнезе и повторные эпизоды ОРВИ не установлено разницы распространённости симптомов между подтверждённым и исключённым COVID-19, кроме гипосмии, частота которой у детей ≥ 6 лет уменьшилась с 14,3% при выписке из больницы до 2,4% через год. Среди пациентов без истории СВД в прошлом и без повторных ОРВИ в течение года PCC *de novo* было редким явлением (2,7–8,0%) без отличий между COVID-19 и ОРВИ другой этиологии. Риски PCC были существенно повышены у пациентов с СВД в анамнезе: скорректированное отношение шансов через 1 мес — 3,19 (95% ДИ 1,89–5,38), через 6 мес — 3,33 (95% ДИ 1,81–6,15). Множественные (5–25) и устойчивые (во всех индексных точках) симптомы, оценённые пациентами как существенные, возникали *de novo* редко — 1,7% (95% ДИ 0,4–4,9), но значительно чаще у детей с СВД в анамнезе — 25% (95% ДИ 13,6–39,6%); разница — 23,3% (10,9–35,7%); отношение шансов 14,8 (4,4–50,6); p < 0,001. Повторные эпизоды ОРВИ были важным фактором риска увеличения жалоб когнитивного кластера и ваготонического СВД через 3–6 мес наблюдения.

Заключение. Получены результаты, косвенно поддерживающие концепцию, в которой PCC представляет собой соматоформное функциональное расстройство, вероятно, социогенного характера у тревожных на исходном уровне пациентов. Некоторые пациенты с последствиями COVID-19 и ОРВИ действительно нуждаются в медицинской и психосоциальной реабилитации. Изучение PCC представляет новые аспекты последствий широко распространённых респираторных вирусных инфекций.

Ключевые слова: *дети, подростки, COVID-19, состояние после COVID-19, пост-острые последствия COVID-19, длительный COVID-19, синдром вегетативной дисфункции, психоэмоциональные расстройства, соматические симптомы, соматоформное расстройство*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 10 от 01.09.2020).

Источник финансирования. Исследование финансировалось Министерством здравоохранения Московской области в рамках перечня научно-исследовательских работ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского по Государственному заданию на 2020–2024 гг. от 15.01.2020.

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

Для цитирования: Мескина Е.Р., Хадисова М.К., Ушакова А.Ю., Целипанова Е.Е., Галкина Л.А. Распространённость, спектр и взаимосвязи краткосрочных и долгосрочных последствий COVID-19 у детей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):43–61.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617
EDN: https://www.elibrary.ru/ppuklt

© Мескина Е.Р., Хадисова М.К., Ушакова А.Ю., Целипанова Е.Е., Галкина Л.А., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

Prevalence, spectrum, and the relations between short-term and long-term post-acute sequelae of COVID-19 in children

Elena R. Meskina✉, Marima K. Khadisova, Anna Yu. Ushakova, Elena E. Tselipanova, Lidiya A. Galkina

Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

Abstract

Background. Data on the prevalence of post-COVID-19 condition (PCC) in children differ due to the lack of specific diagnostic criteria, reliable biomarkers, and limitations of many studies. It is important to study the association between PCC, previous functional disorders, and any events in the post-acute period of COVID-19 to estimate the true burden of PCC in children.

The aim. To determine of the prevalence of PCC in relation to initial functional disorders in children during the year after a mild form of COVID-19 and acute respiratory tract infections (ARTI) of other etiologies.

Materials and methods. The prospective study using a continuous sampling method included children under 18 years of age hospitalized with suspected COVID-19, in whom COVID-19 was confirmed by RT-PCR (*n* = 121) or excluded by molecular and serological methods (ARTI group, *n* = 105). Information on patients was collected from September 2020 to December 2021 by questionnaires at index points: hospital discharge and after 1, 3, 6 and 12 months. Severe COVID-19 and patients with chronic diseases were excluded. Functional disorders in the anamnesis and any events associated with health disorders during the year of observation, the severity of symptoms were taken into account. The analysis was performed in groups of children < 6 years and ≥ 6 years of age. Symptoms were grouped into clusters.

Results. Any symptoms were identified with a frequency of 32–39% (in children < 6 years and ≥6 years, respectively). The most common were psycho-emotional, respiratory and autonomic dysfunction (AD) cluster. Symptoms in most cases were mild with a duration of 3–6 months. After adjustment for age, AD history and recurrent ARTI episodes, no difference was found in the symptom clusters prevalence between confirmed and excluded COVID-19, except for hyposmia, the incidence of which in children ≥6 years decreased from 14.3% at the first index point to 2.4% after one year. Among patients without an AD history and without recurrent ARTI during the year, *de novo* PCC was a rare phenomenon (2.7–8.0%) without differences between COVID-19 and controls. The risks of PCC were significantly increased in patients with an AD history (adjusted OR at 1 month 3.19 (95% CI 1.89–5.38), at 6 months 3.33 (95% CI 1.81–6.15)). Multiple (5–25) and persistent (at all index points) symptoms rated by patients as significant occurred *de novo* rarely (1.7% (95% CI 0.4–4.9)), but significantly more often in children with an AD history — 25%) 95% CI 13.6–39.6%) (difference 23.3% (10.9–35.7%), OR 14.8 (4.4–50.6), $p < 0.001$). Recurrent episodes of ARTI were an important risk factor for an increase in cognitive cluster complaints and vagotonic AD after 3–6 months of observation.

Conclusion. The results obtained indirectly support the concept that PCC is a somatoform functional disorder, probably of sociogenic nature, in patients who are anxious at baseline. Some patients with the COVID-19 and ARTI consequences really need medical and psychosocial rehabilitation. The study of PCC provides new insights into the consequences of widespread respiratory viral infections.

Keywords: *children, adolescents, COVID-19, post-COVID-19 condition, postacute sequelae of SARS CoV-2, long COVID-19, autonomic dysfunction, psycho-emotional disorders, somatic symptoms, somatoform disorders*

Ethics approval. The study was conducted with the voluntary informed consent of the legal representatives of minor patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Moscow Regional Research and Clinical Institute (protocol No. 10, September 1, 2020).

Funding source. The study was funded by the Health Ministry of the Moscow Region as the research within the program commissioned to Moscow Regional Research and Clinical Institute, State-Financed Health Institution of the Moscow Region by the Government for 2020-2024 as of January 15, 2020.

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

For citation: Meskina E.R., Khadisova M.K., Ushakova A.Yu., Tselipanova E.E., Galkina L.A. Prevalence, spectrum, and the relations between short-term and long-term post-acute sequelae of COVID-19 in children. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):43–61.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617
EDN: https://www.elibrary.ru/ppuklt

© Meskina E.R., Khadisova M.K., Ushakova A.Yu., Tselipanova E.E., Galkina L.A., 2025

Введение

Среди множества глобальных проблем пандемии COVID-19 немаловажное место отводится нарушениям здоровья, которые сохраняются, прогрессируют или возникают после острого периода COVID-19, значительно влияя на повседневную деятельность человека и ухудшая качество жизни.

В научной литературе используются несколько терминов, определяющих длительные последствия COVID-19. Они были предложены позже обозначенной проблемы и касаются сроков возникновения и длительности устойчивых симптомов без конкретизации их эпидемиологических и клинических и характеристик. По определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), «состояние после COVID-19 (Post-COVID-19 condition, PCC)» возникает у лиц с историей подтверждённой или вероятной инфекции SARS-CoV-2, когда симптомы, первоначально возникшие в течение 3 мес после острого периода, длятся не менее 2 мес и, как правило, влияют на повседневную деятельность». Это определение может использоваться у пациентов всех возрастов[1] и принято в настоящей публикации. Термин «пост-острые последствия COVID-19 (Postacute sequelae of SARS-CoV-2 (PASC)», предложенный National Institutes of Health, по существу, аналогичен определению ВОЗ [1]. Согласно уточнению другой группы экспертов, термин Long COVID учитывает хотя бы один физический симптом при прочих аналогичных условиях [2]. Отсутствие альтернативной причины нарушений упомянуто как одна их ключевых дефиниций PCC. В настоящее время PCC имеет специальный код нозологической единицы клинического диагноза.

Распространённость, спектр, иерархия и продолжительность симптомов PCC характеризуются значительной гетерогенностью (0,8–74,5%) [3, 4]. У детей и подростков описано более 200 симптомов [5]. С переменным ранговым местом перечислены (в большинстве исследованиях менее 10–20%) слабость, утомляемость, лихорадка, одышка, кашель, головная боль, головокружение, непереносимость физических нагрузок, эмоциональные расстройства, нарушения сна, снижение концентрации, трудности с обучением, гипосмия, дисгевзия, абдоминальная боль [5–7]. Поздние крупные педиатрические контролируемые исследования и метаанализы с сотнями тысяч участников определили симптомы PCC на уровне 25–30% после SARS-CoV-2-инфекции любой формы тяжести у амбулаторных и госпитализированных пациентов [6–8], а также у бессимптомных носителей [9]. Высокое качество исследований ассоциировано с более низким подтверждением PCC [10].

Объединённые оценки инфицированных SARS-CoV-2 детей и неинфицированных (по результатам тестирования при помощи полимеразной цепной реакции) определили одинаковые устойчивые симптомы с небольшой разницей или её отсутствием. Риски отдельных симптомов (гипосмии, дисгевзии, непереносимости физических нагрузок, одышки, когнитивного дефицита, выпадения волос, сердцебиения и усталости) у SARS-CoV-2-положительных пациентов были немного выше, на 2–8% [3, 11], увеличиваясь до 15–30% среди подростков старше 11 лет [12]. Факторы риска педиатрического PCC, помимо подросткового возраста, могут включать женский пол (хотя в остром периоде COVID-19 гендерных отличий не имеет), европейскую расу, тяжёлые формы болезни, пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии, длительность госпитализации, комбинированную коморбидность и исходные нарушения психического здоровья [3, 7, 13]. Другие исследования не обнаружили связи PCC с демографическими показателями (возрастом, полом и расой) [8].

Симптомы могут впервые возникнуть в периоде ранней реконвалесценции COVID-19, сохраняться с различной продолжительностью, колебаться или рецидивировать. У детей траектория основных симптомов PCC снижается со временем от 20–35 до 3–15% без статистических отличий от контроля [7, 14–16]. Распространённость одних симптомов может нарастать через 3–6 мес (до 50–60%) и затем удерживаться на высоком уровне, других — снижаться различными темпами или сохраняться с исходной низкой частотой [16]. У некоторых детей симптомы возникали *de novo* после 6–12 мес наблюдения [18]. Однако через 6 мес после тестирования как у SARS-CoV-2-положительных (24%), так и SARS CoV-2-отрицательных (17%) пациентов обнаруживались симптомы, соответствовавшие определению PCC [18].

В целом, в сравнении со взрослыми, бремя педиатрического PCC было умеренным или низким, симптомы были более лёгкими и регистрировались значительно реже [3, 11, 16]. Тем не менее PCC значительно снижало качество жизни детей [20] и повседневную активность, было помехой в учебе и требовало более частых обращений за медицинской помощью [20].

Проблемы PCC очевидны [10, 21]. Ограничения включают отсутствие стандартизированных клинических паттернов и биомаркеров, позволяющих его описать и диагностировать, что приводит к определённым трудностям диагностики и планирования клинических исследований. Только 35% опубликованных отчётов использовали

[1] WHO. A clinical case definition for post COVID-19 condition in children and adolescents by expert consensus, 16 February 2023. Available at: https://who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post-COVID-19-condition-CA-Clinical-case-definition-2023-1

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

1 из 3 определений PCC (PASC) [22]. Из 110 детей, обратившихся за медицинской помощью с подозрением на PCC, диагноз был подтверждён у 29%, альтернативные соматические/психические заболевания установлены у 47%, причина жалоб осталась невыясненной у 23% [23]. Отзыв, ошибочный отбор, неправильная классификация, отсутствие ответов и/или потеря последующего наблюдения, а также существенная гетерогенность полученных результатов и ограничения метаанализов в связи с недостаточностью данных могут быть объективными недостатками многих публикаций. Тем самым качество доказательств и методологическая строгость ряда научных работ могли быть неоптимальными [4, 6, 10].

С другой стороны, однотипные симптомы у SARS-CoV-2-позитивных и SARS-CoV-2-негативных пациентов предполагают влияние дополнительных факторов, которые до сих пор чётко не определены. В большинстве исследований в качестве предикторов риска PCC указаны хронические заболевания, рутинно зарегистрированные в медицинских базах данных и электронных картах, но не исследовалась роль исходных функциональных расстройств и возможных новых заболеваний в контексте гетерогенного лабильного симптомокомплекса PCC и условий пандемии новой инфекции.

Данное проспективное исследование было запланировано и выполнено на ранних этапах пандемии SARS-CoV-2, но, несмотря на это, результаты его могут быть полезны, т. к. оно является первой попыткой учесть исходные функциональные расстройства у детей в качестве предиктора риска PCC, а также возможность общих последствий COVID-19 и других респираторных инфекций, что, как представляется, поможет достичь лучшего понимания PCC.

Цель исследования — определение распространённости PCC во взаимосвязи с исходными функциональными расстройствами у детей в течение года после нетяжёлой формы COVID-19 и острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) другой этиологии.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено обсервационное продольное исследование методом сплошной выборки краткосрочных и долгосрочных последствий нетяжёлой формы COVID-19 в сравнении с острой респираторной инфекцией другой этиологии у детей любого возраста, госпитализированных в инфекционный стационар. В остром периоде заболевания и в течение года после него наблюдались дети без исходных нарушений здоровья или имевшие в истории развития признаки только функциональных расстройств.

Участники

В исследование включались дети с ОРВИ верхних и нижних дыхательных путей вне зависимости от её сроков. С целью избежать смещения данных, связанных с факторами риска, в исследование не включались дети с тяжёлой и осложнённой формами болезни, имеющие установленные хронические заболевания, а также признаки первичного синдрома вегетативной дисфункции (СВД), в том числе органическое поражение и травмы центральной и периферической нервной системы, чрезмерное перенапряжение нервной системы (отчётливо установленный физический или эмоциональный стресс, занятия спортом в профессиональных секциях), сахарный диабет, ожирение, другие эндокринные нарушения, хронические заболевания сердца, лёгких, нервной, гастроинтестинальной и мочевыводящей систем, иммунодефицит любой этиологии, онкологические и аутоиммунные заболевания.

Пациенты рекрутировались с сентября 2020 г. по декабрь 2021 г., т. е. после первой «волны» уханьского штамма SARS-CoV-2 и до начала распространения генетических вариантов SARS-CoV-2 Omicron в России. В исследование были включены 250 детей в возрасте до 18 лет. COVID-19 был подтверждён рутинными методами на основании положительного теста РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и ротоглотки, взятых в момент госпитализации. Группой сравнения (группа ОРВИ) служили пациенты, у которых COVID-19 был исключён отрицательными мазками из носа и ротоглотки в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и серологическими тестами с определением анти-SARS-CoV-2 IgM и IgG в иммуноферментном анализе перед выпиской из стационара на 7–10-й день болезни. Тестирование на другие респираторные вирусы не проводили. Набор пациентов в каждую группу (COVID-19 и ОРВИ) был остановлен на 125-м включенном пациенте. Из исследования было исключено 9,6% пациентов (COVID-19 — 3,2%, ОРВИ — 16%) в связи с развитием тяжёлой пневмонии или потерей контакта за период исследования. Дополнительно из группы ОРВИ исключались пациенты с диагностическими титрами специфических анти-SARS-CoV-2 IgM и IgG. Сравнительный анализ данных проведён в группах численностью 121 (COVID-19) и 105 (ОРВИ) пациентов.

Лечение COVID-19 в стационаре проводили согласно Временным методическим рекомендациям Министерства здравоохранения РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версии 1–7, а также Методическим рекомендациям Министерства здравоохранения РФ «Особенности клинических проявлений и лечения заболева-

ния, вызванного новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) у детей», версии 1 (03.04.2020) и 2 (03.07.2020), актуальным в тот период.

Сбор информации о пациентах был выполнен путём анкетирования матерей и детей старшего возраста в периоде госпитализации и в течение последующего года при телефонном контакте в индексных (контактных) точках через 1, 3, 6 и 12 мес (± 5 дней) после неё.

Физическое, психоэмоциональное и когнитивное развитие детей различается с возрастом. Оценка состояния здоровья детей младшего возраста в большей мере зависит от сведений, предоставленных матерью. Дети школьного и подросткового возраста в состоянии предъявлять активные жалобы. Поэтому для детей младше и старше 6 лет были разработаны опросники, адаптированные по возрасту. Опросники были составлены с учётом данных литературы и возможных симптомов после перенесённого COVID-19. Оба опросника содержали два блока вопросов. Первый блок (анамнестический) — 15 вопросов, позволяющих оценить функциональные расстройства (в том числе гастроинтестинальные, дисфункцию вегетативной нервной системы (ВНС), психоэмоциональное состояние, заболеваемость) в анамнезе ребёнка. Опросник второго блока (наблюдательный) для детей < 6 лет включал 53 вопроса, а для детей ≥ 6 лет — 76 вопросов. Оба опросника содержали вопросы об активных жалобах, общем состоянии пациента, интенсивности нарушений при их наличии, признаках психоэмоциональных, когнитивных, функциональных (в том числе гастроинтестинальных) расстройств и СВД, субъективных ощущениях боли, частоте обращений к врачу-педиатру и специалистам, любых заболеваниях, в том числе впервые возникших, фактах госпитализаций, фармакологическом лечении. Оценивали также ответы на вопросы: «Ваше самочувствие хуже, чем до заболевания, или такое же?», «Как Вы оцениваете собственные симптомы: как лёгкие, умеренные или серьёзные?», «Симптомы, которые есть в настоящее время, наблюдались до заболевания?». Дополнительно предлагали оценить состояние общего здоровья по 100-балльной шкале. В случае возникновения повторных ОРВИ информацию о тестировании на SARS-CoV-2 собирали со слов матерей.

За период наблюдения всего зарегистрировано 277 повторных эпизодов ОРВИ, из них рутинно тестировано 85,9% детей. COVID-19 в периоде годичного наблюдения был подтверждён в 3 случаях (эти пациенты не были исключены из исследования). Исследованием не были предусмотрены клиническая и инструментальная диагностика СВД, миалгического энцефаломиелита/синдрома хронической усталости, а также другие исследования, оценивающие функцию различных органов и систем. Анализ проведён в группах детей, стратифицированных по возрасту.

Этическая экспертиза

Законные представители пациентов подписали информированное согласие на участие в исследовании, согласились заполнить разработанные анкеты и ответить на вопросы во время телефонных контактов в течение года после выписки из больницы. Протокол исследования и информированное согласие на участие в исследовании одобрены Независимым этическим комитетом МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 10 от 01.09.2020).

Использованные термины и определения

В данной публикации используется термин «Состояние после COVID-19 (Post-COVID-19 condition, PCC)» согласно определению ВОЗ с учётом всех признаков (хотя бы одного) [2], продолжающихся или возникших в течение года. Группы симптомов были сгруппированы по кластерам для удобства их статистического анализа: эмоциональный, когнитивный, усталости, гастроинтестинальный, респираторный и СВД с подкластерами сердечно-сосудистых вегетативных расстройств, симпатикотонического или ваготонического типов. Определения всех использованных терминов подробно представлены в **Дополнительных материалах** на сайте журнала. Следует подчеркнуть, что сгруппированные в кластеры симптомы логически перекрываются. Также представлены отдельные наиболее часто встречающиеся симптомы. Частота новых симптомов определялась как доля участников с симптомом на дату телефонного контакта, но не имевших этого симптома во всех предшествующих индексных точках.

Статистический анализ

Статистический анализ результатов исследования проведён с использованием пакетов программ «Microsoft Excel 2011», «Statistica v. 7.0» («StatSoft Inc.»). Выполнено описание количественных и качественных данных с расчётом значений среднего арифметического (*M*), стандартного отклонения (*SD*), медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей [Q_1; Q_3]. Дискретные признаки представлены в виде доли (%) случаев от общего числа наблюдений. При сравнении нескольких динамических измерений дихотомических переменных использован Q-критерий Кохрена, зависимых качественных показателей — ранговый дисперсионный анализ. При сравнении частот событий в независимых группах применяли критерий χ^2 Пирсона для четырёхпольных и произвольных таблиц, качественных переменных — двусторонний критерий Манна–Уитни, для сравнения парных зависимых переменных — критерий Мак-Немара с поправкой Йетса. При ко-

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

личестве переменных в 1 ячейке четырёхпольной таблицы менее 5 использовали двусторонний критерий Фишера.

Для оценки величины рисков использовали следующие критерии: частоту события в сравниваемых группах, относительный риск (ОР) события в сравниваемых группах, отношение шансов (ОШ) события к отсутствию шансов события в сравниваемых группах с расчётом 95% доверительных интервалов (ДИ). ОШ < 1 свидетельствует о снижении риска, ОШ = 1 — об отсутствии эффекта, ОШ > 1 — об увеличении риска. Предикторы долгосрочных симптомов оценивались с использованием одно- и многомерной модели логистической регрессии и представлены скорректированными ОШ и 95% ДИ. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Младший возраст, дети < 6 лет

Исходно в больнице группа COVID-19 отличалась от группы ОРВИ отсутствием крупа (против 8,6%) и бронхита (против 31% соответственно), но более длительным курсом антибактериальной и противовирусной терапии. Разница была формальной из-за отсутствия рекомендаций выделять соответствующие клинические формы COVID-19. Частота внебольничной пневмонии в сравниваемых группах была сопоставимой. В анамнезе пациентов < 6 лет с COVID-19 чаще регистрировались симптомы СВД, функциональные, в том числе гастроинтестинальные расстройства (24,3% против 5,2%; $p = 0,006$) и атопический дерматит (18,9% против 3,4%; $p = 0,026$). Более подробно характеристика сравниваемых групп представлена в **табл. S1** и **табл. S2** в Дополнительных материалах на сайте журнала.

В момент выписки из больницы жалобы/признаки определены у 32 и 38% пациентов < 6 лет без статистической разницы между группами COVID-19 и ОРВИ (**табл. 1**). В основном нарушения здоровья детей были лёгкими, а количество симптомов/признаков на одного ребёнка — небольшим (как правило, 1–2, не более 3–5). В течение года частота активных жалоб была стабильной в пределах 5–20%. Пик симптомов/признаков, выявленных опросниками, зарегистрирован к 3–6 мес наблюдения с максимальной частотой в группе ОРВИ. Материнская балльная (интегральная) оценка состояния здоровья детей ассоциировалась с данными опросников и продемонстрировала последовательное улучшение после COVID-19 и отсутствие существенных перемен после ОРВИ с худшими в сравнении с COVID-19 показателями, начиная с 3 мес наблюдения (табл. 1).

Типичные симптомы (слабость, утомляемость, дыхательные расстройства) во всех контактных точках встречались очень редко (1–2%). Симптомы СВД, психоэмоциональные расстройства, проблемы со сном и катаральные симптомы были распространены чаще других вне зависимости от группы сравнения. Респонденты групп COVID-19 и ОРВИ отметили симптомы СВД *de novo* в момент выписки из больницы по отношению к периоду до заболевания в 13,5 и 10,3% случаев соответственно ($p > 0,05$; см. табл. 1). Далее по отношению к предшествующей точке контакта новые симптомы СВД возникали в диапазоне 2,0–13,8% в обеих группах. После COVID-19 распространённость эмоциональных расстройств была относительно стабильной, но в группе ОРВИ имела характер параболической кривой с вершиной (20,7%) через 3 мес после выписки из больницы. В целом за год признаки СВД *de novo* появились у 27,0% респондентов группы COVID-19 и 34,5% группы ОРВИ ($p > 0,05$), а новые случаи психоэмоциональных расстройств — у 21,6 и 15,5% соответственно ($p > 0,05$). Все пациенты с СВД в анамнезе периодически указывали на его симптомы в тех или иных точках телефонного контакта. Симптомы СВД на протяжении всего года отсутствовали у 54% детей группы COVID-19 и 65,5% детей группы ОРВИ, расстройства психоэмоциональной сферы — у 73 и 82,8%, сна — у 75,7 и 93,1% соответственно (для всех показателей $p > 0,05$).

Максимальное количество жалоб через 3–6 мес после выписки из больницы ассоциировалось с новыми эпизодами острых респираторных и кишечных инфекций, которые были основной причиной обращений за медицинской помощью. Катаральные симптомы без других признаков в эти сроки встречались нередко и значительно чаще после ОРВИ, чем после COVID-19 (табл. 1). Повторно заболели ОРВИ в течение 3 мес после выписки из больницы 27 и 55,2% ($p = 0,008$) детей в сравниваемых группах, в течение 6 мес — 40,5 и 89,9% соответственно ($p < 0,001$). Подтверждённые случаи острого гастроэнтерита встречались (в разные сроки) у 13,5% детей группы COVID-19 и 6,9% детей группы ОРВИ.

Дополнительно после COVID-19 диагностированы гепатит неустановленной этиологии низкой активности длительностью 3 мес (2,7%; 95% ДИ 0,1–15,8), шейный лимфаденит и инфекция мочевыводящих путей; в группе ОРВИ — ветряная оспа (3 случая), внебольничная пневмония, отит, COVID-19 (1 случай) и инфекция мочевыводящих путей. Ничем не болели в течение года 24,3% детей группы COVID-19 и 6,9% детей группы ОРВИ ($p = 0,033$).

Какие-либо устойчивые нарушения, значительно влияющие на общее состояние здоровья (по самооценкам матерей), во всех временны́х точках имели 3 (8,1%; 95% ДИ 1,7–21,9) ребёнка из группы COVID-19 и 1 (1,7%; 95% ДИ 0,04–9,2%) — из

Таблица 1. Частота регистрации симптомов и признаков у детей младше 6 лет в пост-остром периоде COVID-19 (n = 37) и ОРВИ другой этиологии (n = 58)
Table 1. Frequency of registration of symptoms and signs in children under 6 years in post-acute of COVID-19 (n = 37) and ARTI of other etiology (n = 58)

Жалобы, симптомы, признаки Complaints, symptoms, signs		Выписка из больницы Discharge from the hospital	Через 1 мес After 1 month	Через 3 мес After 3 months	Через 6 мес After 6 months	Через 12 мес After 12 months	p_2
Самочувствие нарушено (самооценка), n (%) Well-being is impaired (self-assessment), n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	6 (16,2) 8 (13,8)	4 (10,8) 7 (12,1)	7 (18,9) 12 (20,7)	8 (21,6) 8 (13,8)	6 (16,2) 3 (5,2)	0,699 0,185
в том числе в лёгкой степени including mild cases	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (13,5) 5 (8,6)	4 (10,8) 4 (6,9)	6 (16,2) 11 (19,0)	7 (18,9) 6 (10,3)	6 (16,2) 3 (5,2)	0,914 0,066
Жалобы/симптомы, всего (любые, хотя бы один признак, выявленный анкетированием), n (%) Complaints/symptoms, total (any, at least one sign identified by the questionnaire), n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	12 (32,4) 22 (37,9)	8 (21,6) 25 (43,1) p_1 = 0,033	10 (27,0) 35 (60,3) p_1 = 0,002	17 (45,9) 26 (44,8)	10 (27,0) 25 (43,1)	0,061 0,035
Среднее количество признаков, $M \pm SD$ The average quantity of signs, $M \pm SD$	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1,3 ± 0,1 1,8 ± 0,8	1,5 ± 0,8 2,4 ± 1,2	1,4 ± 0,8 1,8 ± 0,9	2,4 ± 1,6 1,8 ± 1,2	1,9 ± 1,1 1,8 ± 1,0	0,670 0,734
Средний балл самооценки общего состояния здоровья, $M \pm SD$ / Me [Q_1; Q_3] The average quantity of signs, $M \pm SD$ / Me [Q_1; Q_3]	COVID-19 ОРВИ | ARTI	87,8 ± 17,3 / 90 [80; 100] 91,3 ± 12,2 / 100 [80; 100] p_1 = 0,329	95,4 ± 7,3 / 100 [90; 100] 90,7 ± 11,1 / 100 [80; 100] p_1 = 0,076	97,3 ± 6,5 / 100 [100; 100] 92,2 ± 10,9 / 100 [80; 100] p_1 = 0,021	97,3 ± 8,7 / 100 [100; 100] 92,4 ± 11,7 / 100 [80; 100] p_1 = 0,018	98,9 ± 5,2 / 100 [100; 100] 94,7 ± 9,2 / 100 [90; 100] p_1 = 0,008	< 0,001 0,314
Слабость, утомляемость, нарушение двигательной активности, n (%) Weakness, fatigue, locomotor activity decreased, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (2,7) 1 (1,7)	1 (2,7) 2 (3,4)	1 (2,7) 1 (1,7)	2 (5,4) –	1 (2,7) –	0,406 0,147
Кожная сыпь, n (%) Skin rash, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– 3 (5,2)	– –	2 (5,4) 5 (8,6)	1 (2,7) 2 (3,4)	– 3 (5,2)	– –
Выпадение волос, n (%) Hair loss, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	– 2 (3,4)	1 (2,7) –	– –	– –	– –
Одышка без катаральных симптомов, n (%) dyspnea without catarrhal symptoms, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– 1 (1,7)	1 (2,7) –	– –	– –	– –	– –
Психоэмоциональные расстройства, n (%) Psychoemotional disorders, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	2 (5,4) 3 (5,2)	6 (16,2) 10 (17,2)	6 (16,2) 12 (20,7)	5 (13,5) 8 (13,8)	2 (5,4) 7 (12,1)	0,234 0,002
*Психоэмоциональные расстройства *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, n (%) Psychoemotional disorders *de novo* in relation to the previous time point, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (2,7) –	2 (5,4) 6 (10,3)	4 (10,9) 3 (5,2)	1 (2,7) –	– –	– –
Нарушения сна, беспокойный сон, n (%) Sleep disorders, restless sleep, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	6 (16,2) 1 (1,7) p_1 = 0,013	2 (5,4) 2 (3,4)	5 (13,5) 2 (3,4)	3 (8,1) 2 (3,4)	1 (2,7) 3 (5,2)	0,060 0,644
*Нарушения сна, беспокойный сон *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, n (%) Sleep disorders, restless sleep *de novo* in relation to the previous time point, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (13,5) 1 (1,7) p_1 = 0,032	1 (2,7) 1 (1,7)	2 (5,4) 1 (1,7)	– 1 (1,7)	– –	– –
Когнитивная дисфункция, n (%) Cognitive dysfunction, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (2,7) –	2 (5,4) –	1 (2,7) –	3 (8,1) –	2 (5,4) –	0,406 0,406
Симптомы СВД (любые признаки), n (%) Autonomic dysfunction (any signs), n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	10 (27,0) 11 (19,0)	7 (18,9) 16 (27,6)	7 (18,9) 13 (22,4)	7 (18,9) 10 (17,2)	7 (18,9) 12 (20,7)	0,670 0,111
*Симптомы СВД *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, n (%) AD *de novo* in relation to the previous time point, n (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (13,5) 6 (10,3)	3 (8,1) 8 (13,8)	– 1 (1,7)	– 2 (3,4)	2 (5,4) 2 (3,4)	– –

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

Окончание табл. 1 | End of the Table 1

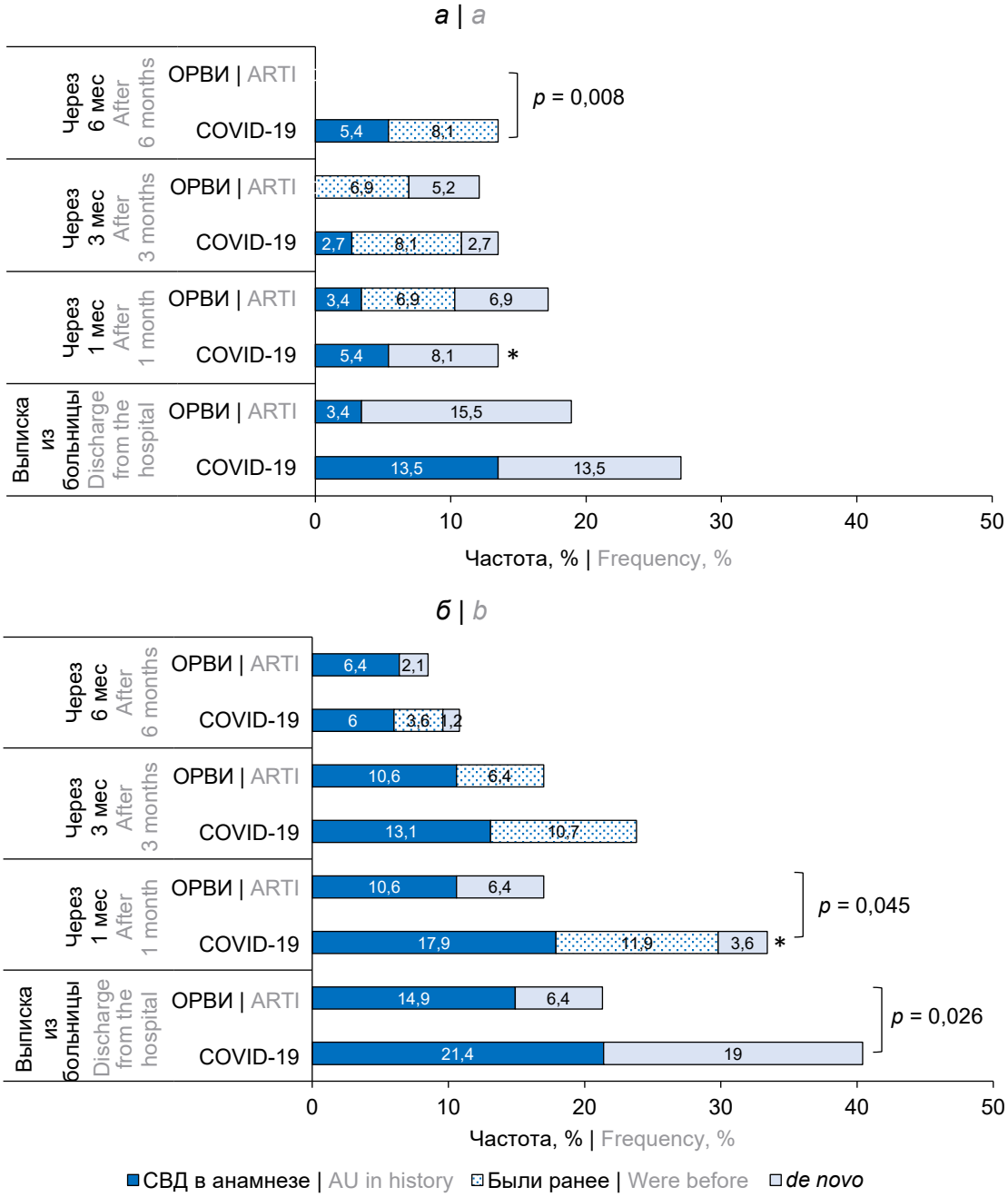
Жалобы, симптомы, признаки Complaints, symptoms, signs		Выписка из больницы Discharge from the hospital	Через 1 мес After 1 month	Через 3 мес After 3 months	Через 6 мес After 6 months	Через 12 мес After 12 months	p_2
Гастроинтестинальные расстройства (всего), *n* (%) Gastrointestinal disorders (total), *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (8,1) 5 (8,6)	2 (5,4) 13 (22,4) p_1 = 0,041	1 (2,7) 5 (8,6)	12 (32,4) 5 (8,6) p_1 = 0,004	3 (8,1) 3 (3,4)	< 0,001 0,016
в том числе: | including:							
боли в животе abdominal pain	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– 2 (3,4)	1 (2,7) 2 (3,4)	– 1 (1,7)	– 1 (1,7)	2 (5,4) 1 (1,7)	
запор constipation	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (2,7) 1 (1,7)	1 (2,7) –	1 (2,7) 2 (3,4)	1 (2,7) 1 (1,7)	– –	
диарея diarrhea	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– 2 (3,4)	– 12 (20,7)	– 2 (3,4)	11 (29,7) 3 (5,2)	1 (2,7) 1 (1,7)	
*Гастроинтестинальные расстройства *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, *n* (%) Gastrointestinal disorders *de novo* in relation to the previous time point, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– 3 (5,0)	1 (2,7) 11 (18,3) p_1 = 0,026	– 3 (5,2)	3 (8,1) 1 (1,7)	1 (2,7) –	– –
Катаральные симптомы на момент телефонного контакта, *n* (%) Catarrhal symptoms at the telephone contact, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	2 (5,4) 15 (25,9) p_1 = 0,013	1 (2,7) 14 (24,1) p_1 = 0,003	2 (5,4) 21 (36,2) p_1 < 0,001	4 (10,8) 18 (31,0) p_1 = 0,023	4 (10,8) 21 (36,2) p_1 = 0,004	0,435 0,433
Только катаральные симптомы, *n* (%) Catarrhal symptoms only, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	2 (5,4) 11 (19,0) 0,061	2 (5,4) 3 (5,2)	1 (2,7) 16 (27,6) p_1 = 0,002	2 (5,4) 10 (17,2) p_1 = 0,091	2 (5,4) 10 (17,2) p_1 = 0,091	0,910 0,006
Повторные эпизоды ОРВИ между точками телефонного контакта, *n* (%) Recurrent episodes of ARTI episodes between the points of telephone contact, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	6 (16,2) 16 (27,6)	5 (13,5) 27 (46,6) p_1 < 0,001	11 (29,7) 29 (50,0) p_1 = 0,052	18 (48,6) 25 (43,1)	< 0,001 0,045
Частота осложнённого течения ОРВИ (круп, пневмония фебрильные судороги, лимфаденит), *n* (%) Frequency of complicated course of ARTI (croup, pneumonia, febrile convulsions, lymphadenitis), *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	– 3 (5,1)	– 2 (3,4)	1 (2,7) 2(3,4)	1 (2,7) 1 (1,7)	– –
Частота антибактериальной терапии, *n* (%) ABT frequency, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	– 3 (5,1)	– 7 (12,1)	2 (5,4) 9 (15,5)	– 7 (12,1)	– 0,089
Количество детей, обращавшихся к врачу за период между точками телефонного контакта, *n* (%) The children number with doctor's appointment between telephone contact points, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	6 (16,2) 17 (29,3)	7 (18,9) 27 (46,6) p_1 = 0,007	13 (35,1) 26 (44,8)	12 (32,4) 22 (37,9)	0,056 0,155
Среднее число обращений к врачу, *M* ± *SD* Average number of medical appointments, *M* ± *SD*	COVID-19 ОРВИ | ARTI		1,2 ± 0,4 1,1 ± 0,7	1,9 ± 0,9 1,2 ± 0,5	1,5 ± 0,9 1,2 ± 0,6	1,3 ± 0,5 1,2 ± 0,5	0,428 0,391
Количество госпитализаций между точками телефонного контакта, *n* (%) The hospitalizations number between telephone contact points, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	– 3 (5,1)	1 (2,7) –	1 (2,7) 3 (5,1)	2 (5,4) –	– –

Примечание. Здесь и в табл. 2: *в момент выписки из больницы признаки *de novo* по отношению к периоду до заболевания. Для сравнения динамики частот признаков в группах (p_1) использован Q-критерий Кохрена, качественных признаков — ранговый дисперсионный анализ, для сравнения парных зависимых признаков (p_2) — критерий Мак-Немара, для сравнения парных независимых признаков — χ^2 для четырёхпольных таблиц с поправкой Йетса или двусторонний критерий Фишера.

Note. Here and in the Table 2: *At the time of discharge from the hospital, signs de novo in relation to the period before the disease. AD — autonomic dysfunction, ABT — antibacterial therapy. The Cochran's Q test was used to compare the dynamics of the frequency of signs in groups (p_1), rank analysis of variance was used to compare qualitative signs, the McNemar's test was used to compare paired dependent characteristics (p_2), χ^2 for four-field tables with the Yeats correction or two-tailed Fisher's test were used to compare paired independent features.

группы ОРВИ ($p = 0,050$). Однако подобные симптомы регистрировались в анамнезе этих пациентов и до включения в исследование. У остальных детей жалобы/признаки имели преходящий характер. Не установлено влияния возраста и пола на изучаемые показатели у детей < 6 лет.

Общая частота случаев, соответствующих определению PCC, у детей < 6 лет через 1, 3, 6 и 12 мес после выписки из больницы была относительно стабильной и составила после COVID-19 — 19, 24, 30 и 16%, после ОРВИ — 19, 24, 24 и 15,5% (во всех точках $p > 0,05$). Но после исключения паци-



Частота PCC (согласно определению ВОЗ) в группах COVID-19 и ОРВИ у неболевших с учётом СВД в анамнезе и симптомов *de novo*.

а — дети младше 6 лет; *б* — дети в возрасте 6–18 лет.
*$p = 0,027$ между детьми < 6 лет и ≥ 6 лет; в ряду «были ранее» представлены симптомы, регистрировавшиеся по отношению к предыдущей временно́й точке.

Incidence of PCC (as defined by WHO) in non-sick children in COVID-19 and ARTI groups over time, adjusted for AD history and *de novo* symptoms.

a — children under 6 years old; *b* — children aged 6–18 years.
*$p = 0.027$ between children < 6 years and ≥ 6 years; the "were before" series presented symptoms recorded in relation to the previous time point; PCC — post-COVID-19 condition; AD — autonomic dysfunction.

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

ентов, болевших острыми инфекциями или другими установленными заболеваниями, оказалось, что PCC регистрировалось *de novo* редко — 2,7–8,1% через 1–3 мес после выписки из больницы, и отсутствовало через 6 мес (**рисунок**, *а*).

Скорректированные шансы симптомов СВД (сОШ = 2,192; 95% ДИ 1,246–3,865; p = 0,007) или эмоциональных расстройств (сОШ = 2,081; 95% ДИ 1,035–4,187; p = 0,039) были повышены к 6 мес после выписки из больницы как у SARS-CoV-2-позитивных, так и SARS-CoV-2-негативных пациентов в том случае, если они повторно болели ОРВИ.

Старший возраст, дети ≥ 6 лет

Группа COVID-19 отличалась от группы ОРВИ смещением возрастной структуры в сторону преобладания подростков 10–17 лет (70,2% против 51,1%; p = 0,024), группа ОРВИ — более высокой частотой бронхита и более короткой продолжительностью антибактериальной терапии и противовирусной терапии (аналогично детям младшего возраста). Анамнез пациентов ≥ 6 лет не отличался, за исключением более частой истории внебольничной пневмонии среди госпитализированных с ОРВИ (**табл. S3** и **табл. S4** в Дополнительных материалах на сайте журнала).

Дети ≥ 6 лет оценивали свое состояние здоровья хуже, чем пациенты < 6 лет (**табл. 2**; **табл. S5** в Дополнительных материалах на сайте журнала). В момент выписки из больницы частота жалоб и симптомов была выше (36,9%) в группе COVID-19, чем в группе ОРВИ (8,5%; табл. 2). В течение года самооценка нарушений здоровья после COVID-19 свидетельствовала об умеренном улучшении в соответствии со средним интегральным баллом. В группе ОРВИ динамика изменений имела обратную направленность (табл. 2). Пациенты ≥ 6 лет предъявляли более широкий спектр жалоб, и их среднее число на 1 ребёнка было выше, чем у детей < 6 лет, во всех точках телефонного контакта. Доля детей с большим количеством жалоб/признаков (6–25) колебалась в диапазоне 2–13% без различий между группами и временны́ми точками. Почти во всех случаях (87–88%) множественные жалобы предъявляли дети с исходными функциональными расстройствами здоровья в анамнезе.

Дети ≥ 6 лет чаще жаловались на слабость/утомляемость, головную боль и эмоциональные расстройства (2,4–23,8%) и редко (1–7%) — на непереносимость физических и психических нагрузок, когнитивную дисфункцию, затруднённое дыхание, нарушение сна, выпадение волос и гастроинтестинальные расстройства. При «грубой» оценке в раннем периоде реконвалесценции распространённость признаков СВД (разница 19,2% (95% ДИ 3,5–34,9%); ОР = 0,9 (95% ДИ 0,04–2,50)), сердечно-сосудистых симптомов (разница 13,3% (95% ДИ 4,6–22,1%); ОР = 6,27 (95% ДИ 0,02–53,1)), субфебрильного состояния (разница 12,2% (95% ДИ 3,6–20,7%); ОР = 5,7 (95% ДИ 0,10–49,2)) и гипосмии (разница 14,3%) после COVID-19 была выше, чем после ОРВИ (табл. 2). Однако повышение рисков, связанных с COVID-19, было несущественным.

В течение года после COVID-19 распространённость доминирующих признаков, включая комплекс симптомов СВД по ваготоническому типу, последовательно снижалась (табл. 2). Другие кластеры и симптомы регистрировались на стабильном уровне. Гипосмия постепенно купировалась, но через 12 мес субъективно сохранялась в 2,4% (95% ДИ 0,6–9,1) случаев. Число новых заболеваний (в основном повторных ОРВИ) увеличилось к 6 мес и затем снизилось. В течение 6 мес после COVID-19 диагностированы 2 случая артрита (2,4%; 95% ДИ 0,4–9,1%), геморрагический васкулит (1,2%; 94% ДИ 0–7,4%), внебольничная пневмония, гнойно-воспалительные заболевания (2 случая).

После ОРВИ траектория распространённости основных симптомов была иной. Сумма симптомов СВД за счёт слабости/утомляемости, головных болей утомления и в целом вегетативной дисфункции по ваготоническому типу наросла к 3–6 мес, затем снизилась к концу года. Регистрация других нереспираторных симптомов не отличалась от COVID-19. Существенную долю причин нарушения здоровья составляли новые эпизоды ОРВИ и связанные с ними катаральные симптомы. После исходной ОРВИ в единичных случаях диагностированы цистит, бактериальный синусит и 2 эпизода COVID-19, в том числе один с гипосмией (табл. 2).

В целом, после COVID-19 (как и среди детей < 6 лет) по сравнению с группой ОРВИ риски новых эпизодов респираторных инфекций оказались более низкими через 3 мес (на 31,3% (95% ДИ 16,9–47,3); ОР = 0,79 (95% ДИ 0,55–0,91)) и через 6 мес (на 23,7% (95% ДИ 7,6–39,9); ОР = 0,59 (95% ДИ 0,26–0,77)). Соответственно ниже (на 22,1% (95% ДИ 5,3–38,9); ОР = 0,49 (95% ДИ 0,16–0,70)) была обращаемость к педиатру. В течение года среди детей ≥ 6 лет в сравниваемых группах какие-либо симптомы отсутствовали в 47,6% случаев в группе COVID-19 и в 61,7% — в группе ОРВИ (p = 0,122).

Частота PCC в сравниваемых группах была стабильной в течение полугода и умеренно снизилась через год (группа COVID-19: 44,0; 41,7; 42,9 и 33,3%; группа ОРВИ — 40,4; 40,4; 36,2 и 17,0% в индексных точках соответственно; p > 0,05). PCC чаще встречалось у детей ≥ 6 лет, чем у детей < 6 лет, через 1 мес после выписки из больницы (группа COVID-19: возрастная разница 22,7% (95% ДИ 6,3–39,3); ОР = 1,20 (95% ДИ 0,08–3,50); p = 0,009; группа ОРВИ: разница 21,5% (95% ДИ

Таблица 2. Частота регистрации симптомов и признаков у детей 6–18 лет в пост-остром периоде COVID-19 (*n* = 84) и ОРВИ другой этиологии (*n* = 47)
Table 2. Frequency of registration of symptoms and signs in children from 6 to 18 years in post-acute of COVID-19 (*n* = 84) and ARTI of other etiology (*n* = 47)

Жалобы, симптомы, признаки Complaints, symptoms, signs		Выписка из больницы Discharge from the hospital	Через 1 мес After 1 month	Через 3 мес After 3 months	Через 6 мес After 6 months	Через 12 мес After 12 months	p_2
Самочувствие нарушено (самооценка), *n* (%) Well-being is impaired (self-assessment), *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	31 (36,9) 4 (8,5) p_1 < 0,001	30 (35,7) 11 (23,4)	23 (27,4) 11 (23,4)	25 (29,8) 10 (21,3)	19 (22,6) 11 (23,4)	< 0,009 0,149
в том числе в лёгкой степени including to a mild	COVID-19 ОРВИ | ARTI	20 (23,8) 2 (4,3) p_1 = 0,001	20 (23,8) 9 (19,1)	16 (19,0) 9 (19,1)	15 (17,9) 8 (17,0)	15 (17,9) 8 (17,0)	< 0,009 0,267
Жалобы/симптомы, всего (любые, хотя бы один признак, выявленный анкетированием), *n* (%) Complaints/symptoms, total (any, at least one sign identified by the questionnaire), *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	33 (39,3) 10 (21,3) p_1 = 0,036	38 (45,2) 22 (46,8)	36 (42,9) 24 (51,1)	38 (45,2) 23 (48,9)	33 (39,3) 24(51,7)	0,617 0,002
Среднее количество признаков, *M* ± *SD* / Me [Q_1; Q_3] The average quantity of signs, *M* ± *SD* / Me [Q_1; Q_3]	COVID-19 ОРВИ | ARTI	4,5 ± 5,0 / 3 [2–5] 2,0 ± 1,9 / 1 [1–2] p_1 = 0,019	5,0 ± 4,9 / 3 [2–5] 3,0 ± 2,4 / 2 [1–4] p_1 = 0,081	4,8 ± 5,0 / 3 [2,0–5,5] 3,6 ± 02,5 / 3 [1,5–5,5] p_1 = 0,718	4,3 ± 3,9 / 3 [2–5] 3,3 ± 2,5 / 2 [1,0–5,5] p_1 = 0,344	4,3 ± 3,6 / 3 [2–6] 2,9 ± 1,9 / 2 [2,0–4,5] p_1 = 0,209	0,464 0,346
Средний балл самооценки общего состояния здоровья, *M* ± *SD* / Me [Q_1–Q_3] The average quantity of signs, *M* ± *SD* / Me [Q_1; Q_3]	COVID-19 ОРВИ | ARTI	86,5 ± 16,6 95 [70; 100] 95,1 ± 10,0 / 100 [100; 100] p_1 = 0,001	89,3 ± 15,6 100 [80; 100] 89,8 ± 15,4 / 100 [80; 100] p_1 = 0,803	91,4 ± 14,4 100 [80; 100] 89,8 ± 15,4 / 100 [80; 100] p_1 = 0,576	92,4 ± 14,7 100 [85; 100] 90,4 ± 14,1 / 100 [80; 100] p_1 = 0,354	94,9 ± 11,7 100 [80; 100] 89,4 ± 15,7 / 100 [70; 100] p_1 = 0,040	< 0,001 0,049
Слабость, утомляемость, нарушение двигательной активности, *n* (%) Weakness, fatigue, locomotor activity decreased, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	20 (23,8) 5 (10,6)	23 (27,4) 11 (23,4)	18 (21,4) 11 (23,4)	17 (20,2) 10 (21,3)	11 (13,1) 6 (12,8)	0,018 0,044
*Слабость, утомляемость, нарушение двигательной активности *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, *n* (%) Weakness, fatigue, locomotor activity decreased *de novo* in relation to the previous time point, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	12 (14,3) 3 (6,4)	5 (6,0) 5 (10,6)	1 (1,2) –	5 (6,0) 2 (4,3)	– 1 (2,1)	–
Субфебрилитет более 2 нед, *n* (%) Subfebrile conditions (more than 2 weeks), *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	9 (10,7) 1 (2,1) p_1 = 0,076	12 (14,3) 1 (2,1) p_1 = 0,031	10 (11,9) 1 (2,1) p_1 = 0,053	7 (8,3) 1 (2,1)	5 (6,0) –	0,080 0,809
Головная боль, *n* (%) Headache, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	15 (17,9) 3 (6,4) p_1 = 0,068	16 (19,0) 6 (12,8)	14 (16,7) 6 (12,8)	15 (17,9) 6 (12,8)	15 (17,9) 3 (6,4) p_1 = 0,068	0,982 0,224
*Головная боль *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, *n* (%) Headache *de novo* in relation to the previous time point, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	7 (8,3) 1 (2,1)	4 (4,8) 2 (4,3)	– –	1 (1,2) 2 (4,3)	3 (3,6) –	– –
Боли в мышцах, спазмы мышц, *n* (%) Muscle pain, muscle spasms, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	2 (2,4) –	2 (2,4) 1 (2,1)	3 (3,6) –	3 (3,6) –	3 (3,6) –	– –
Гипосмия, *n* (%) Hyposmia, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	12 (14,3) –	6 (7,1) 1 (2,1)	3 (3,6) 1 (2,1)	3 (3,6) –	2 (2,4) –	< 0,001 –
Кожная сыпь, *n* (%) Skin rash, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	1 (1,2) 1 (2,1)	2 (2,4) 1 (2,1)	1 (1,2) –	1 (1,2) 1 (2,1)	– –

Продолжение табл. 2 | Continuation of the Table 2

Жалобы, симптомы, признаки Complaints, symptoms, signs		Выписка из больницы Discharge from the hospital	Через 1 мес After 1 month	Через 3 мес After 3 months	Через 6 мес After 6 months	Через 12 мес After 12 months	p_2
Выпадение волос, *n* (%) Hair loss, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (1,2) –	3 (3,6) 1 (2,1)	3 (3,6) 1 (2,1)	2 (2,4) 1 (2,1)	3 (3,6) –	– –
Артрит, боли в суставах, *n* (%) Arthritis, joint pain, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	1 (1,2) –	2 (2,4) –	2 (2,4) –	2 (2,4) –	– –
Одышка без катаральных симптомов, *n* (%) Dyspnea without catarrhal symptoms, *n* (%)							
в покое | at rest	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (1,2) –	1 (1,2) –	1 (1,2) –	1 (1,2) –	1 (1,2) –	–
при нагрузке | at load	COVID-19 ОРВИ | ARTI	2 (2,4) –	4 (4,8) –	4 (4,8) –	3 (3,6) –	3 (3,6) –	–
Психоэмоциональные расстройства, *n* (%) Psychoemotional disorders, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	10 (11,9) 2 (4,3)	12 (14,3) 4 (8,5)	14 (16,7) 4 (8,5)	12 (14,3) 5 (10,6)	13 (15,5) 5 (10,6)	0,354 0,329
в том числе: | including: тревога и депрессия | anxiety and depression	COVID-19 ОРВИ | ARTI	3 (3,6) 1 (2,1)	3 (3,6) 1 (2,1)	4 (4,8) 1 (2,1)	4 (4,8) 1 (2,1)	3 (3,6) 1 (2,1)	0,531 0,406
панические атаки | panic attacks	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (1,2) –	– –	1 (1,2) –	1 (1,2) –	– –	– –
*Психоэмоциональные расстройства *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, *n* (%) Psychoemotional disorders *de novo* in relation to the previous time point, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (6,0) 1 (2,1)	3 (3,6) 2 (4,2)	1 (1,2) –	– 1 (2,1)	2 (2,4) –	– –
Непереносимость физических нагрузок, *n* (%) Intolerance to physical activity, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	6 (7,1) –	5 (6,0) 3 (6,4)	9 (10,7) 3 (6,4)	7 (8,7) 3 (6,4)	5 (6,0) 1 (2,1)	0,405 0,092
Непереносимость эмоциональных нагрузок, *n* (%) Intolerance to emotional stress, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (6,0) –	5 (6,0) 2 (4,3)	4 (4,8) 2 (4,3)	3 (3,6) 1 (2,1)	4 (4,8) 3 (6,4)	0,800 0,316
Нарушения сна, беспокойный сон, *n* (%) Sleep disorders, restless sleep, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	2 (2,4) 1 (2,1)	5 (6,0) 2 (4,3)	4 (4,8) 2 (4,3)	5 (6,0) 1 (2,1)	5 (6,0) 2 (4,3)	0,437 0,558
*Нарушения сна, беспокойный сон *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, *n* (%) Sleep disorders, restless sleep *de novo* in relation to the previous time point, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (1,2) 1 (2,1)	2 (2,4) 1 (2,1)	1 (1,2) –	1 (1,2) –	2 (2,4) –	– –
Когнитивная дисфункция, *n* (%) Cognitive dysfunction, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	8 (9,5) 2 (4,3)	13 (15,5) 5 (10,6)	11 (13,1) 5 (10,6)	12 (14,3) 8 (17,0)	9 (10,7) 1 (2,1)	0,220 0,009
в том числе нарушение памяти including memory impairment	COVID-19 ОРВИ | ARTI	3 (3,6) –	5 (6,0) –	5 (6,0) –	6 (7,1) 1 (2,1)	7 (8,3) 1 (2,1)	0,149 0,406
Симптомы СВД (любые признаки), *n* (%) Autonomic dysfunction (any signs), *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	34 (40,5) 10 (21,3) p_1 = 0,026	34 (40,5) 15 (31,9)	30 (35,7) 16 (34,0)	31 (36,9) 15 (31,9)	26 (31,0) 9 (19,1)	0,436 0,002
*Симптомы СВД *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, *n* (%) AD *de novo* in relation to the previous time point, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	16 (19,0) 3 (6,4) p_1 = 0,086	4 (4,8) 5 (10,6)	– –	6 (7,1) 3 (6,4)	2 (2,4) –	– –
Сердечно-сосудистые симптомы, *n* (%) Cardiovascular symptoms, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	13 (15,5) 1 (2,1) p_1 = 0,018	18 (21,4) 4 (8,5) p_1 = 0,058	6 (7,1) 2 (4,3)	9 (10,7) 2 (4,3)	11 (13,1) 1 (2,1) p_1 = 0,054	0,011 0,406

Окончание табл. 2 | End of the Table 2

Жалобы, симптомы, признаки Complaints, symptoms, signs		Выписка из больницы Discharge from the hospital	Через 1 мес After 1 month	Через 3 мес After 3 months	Через 6 мес After 6 months	Через 12 мес After 12 months	p_2
СВД по адренергическому типу, *n* (%) Adrenergic autonomic dysfunction, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	13 (15,5) 2 (4,3) p_1 = 0,054	19 (22,6) 10 (21,3)	17 (20,2) 5 (10,6)	15 (17,9) 6 (12,8)	11 (13,1) 4 (14,9)	0,243 0,033
СВД по ваготоническому типу, *n* (%) Vagotonic autonomic dysfunction, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	14 (16,7) 5 (10,6)	10 (11,9) 4 (8,5)	5 (6,0) 8 (17,0) p_1 = 0,043	8 (9,5) 7 (14,9)	8 (9,5) 1 (2,1)	0,032 0,046
СВД по смешанному типу, *n* (%) Mixed-type autonomic dysfunction, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (6,0) –	5 (6,0) 1 (2,1)	8 (9,5) 3 (6,4)	8 (9,5) 2 (4,2)	7 (8,3) 1 (2,1)	0,771 0,363
Гастроинтестинальные расстройства, *n* (%) Gastrointestinal disorders, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (6,0) —	10 (11,9) 6 (12,8)	11 (13,1) 6 (12,8)	11 (13,1) 3 (6,4)	10 (11,9) 2 (4,3)	0,135 0,005
в том числе: | including: боли в животе | abdominal pain	COVID-19 ОРВИ | ARTI	4 (4,8) –	9 (10,7) 5 (10,6)	9 (10,7) 5 (10,6)	9 (10,7) 3 (6,4)	9 (10,7) 2 (4,2)	
запор | constipation	COVID-19 ОРВИ | ARTI	2 (2,4) –	2 (2,4) –	2 (2,4) –	– –	– –	
диарея | diarrhea	COVID-19 ОРВИ | ARTI	1 (1,2) –	1 (1,2) 2 (4,3)	2 (2,4) –	1 (1,2) –	1 (1,2) –	
*Гастроинтестинальные расстройства *de novo* по отношению к предыдущей временно́й точке, *n* (%) Gastrointestinal disorders *de novo* in relation to the previous time point, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (6,0) –	1 (1,2) –	1 (1,2) –	2 (2,4) 1 (4,3)	1 (1,2) –	– –
Катаральные симптомы на момент телефонного контакта, *n* (%) Catarrhal symptoms at the telephone contact, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	5 (6,0) 1 (2,1)	5 (6,0) 7 (14,9) p_1 = 0,089	5 (6,0) 14 (29,8) p_1 < 0,001	8 (9,5) 15 (31,9) p_1 = 0,067	5 (6,0) 16 (34,0) p_1 < 0,001	0,725 < 0,001
Только катаральные симптомы, *n* (%) Catarrhal symptoms only, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	1 (1,2) 3 (6,4) p_1 = 0,092	1 (1,2) 5 (10,6) p_1 = 0,022	5 (6,0) 7 (14,9) p_1 = 0,017	– 9 (19,1) p_1 < 0,001	0,287 0,009
Повторные эпизоды ОРВИ между точками телефонного контакта, *n* (%) Recurrent episodes of ARTI episodes between the points of telephone contact, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	7 (8,3) 19 (40,4) p_1 < 0,001	14 (16,7) 19 (40,4) p_1 = 0,003	26 (31,0) 20 (42,6)	17 (20,2) 18 (28,3)	0,002 0,976
Всего заболеваний, *n* (%) Total diseases, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI		10 (11,9) 21 (44,7) p_1 < 0,001	17 (20,2) 21 (44,7) p_1 = 0,004	34 (30,5) 21 (44,7)	19 (22,6) 18 (38,3) p_1 = 0,056	< 0,001 0,872
Частота антибактериальной терапии, *n* (%) ABT frequency, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	6 (7,1) 5 (10,6)	1 (1,2) 5 (10,6) p_1 = 0,022	8 (9,5) 3 (6,4)	7 (8,3) 3 (6,4)	0,079 0,082
Количество детей, обращавшихся к врачу за период между точками телефонного контакта, *n* (%) The children number with doctor's appointment between telephone contact points, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	19 (22,6) 21 (44,7) p_1 = 0,009	25 (29,8) 22 (46,8) p_1 =0,052	36 (42,9) 19 (40,4)	28 (33,3) 16 (34,0)	0,014 0,506
Среднее число обращений к врачу, *M* ± *SD* Average number of medical appointments, *M* ± *SD*	COVID-19 ОРВИ | ARTI	–	2,3 ± 1,4 2,9 ± 2,1	1,8 ± 2,1 1,7 ± 1,2	1,3 ± 0,7 1,5 ± 0,6	1,4 ± 0,9 1,7 ± 0,9	0,029 1,0
Количество госпитализаций между точками телефонного контакта, *n* (%) The hospitalizations number between telephone contact points, *n* (%)	COVID-19 ОРВИ | ARTI	– –	– 1 (2,1)	– 1 (2,1)	3 (3,6) 1 (2,1)	1 (1,2) 1 (2,1)	– –

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

Таблица 3. Скорректированное по признакам вегетативной дисфункции в анамнезе и заболеваемостью ОРВИ ОШ у детей ≥ 6 лет

Table 3. History of autonomic dysfunction and incidence of acute respiratory infections adjusted odds ratio in children ≥ 6 years

Признак | Sign	сОШ Adjusted OR	95% ДИ 95% CI	*p*
Шансы повышены после COVID-19 | Odds are increased after COVID-19			
Самочувствие нарушено (самооценка), выписка из больницы Well-being is impaired (self-assessment)	2,038	1,141–3,644	0,016
в том числе у детей ≥ 12 лет | including children ≥ 12 years	1,634	1,065–2,507	0,037
Симптомы СВД (любые признаки), выписка из больницы Autonomic dysfunction (any signs), discharge from the hospital	4,509	2,377–8,559	< 0,001
Шансы повышены после ОРВИ | Odds are increased after ARTI			
Самочувствие нарушено (самооценка) через 6 мес Well-being is impaired (self-assessment) after 6 months	2,484	1,365–4,518	0,003
***Шансы повышены у детей с СВД в анамнезе вне зависимости от группы COVID-19/ОРВИ Odds are increased in children with a history of autonomic dysfunction regardless of COVID-19/ARTI group**			
PCC через 1 мес | After 1 months	3,187	1,889–5,381	< 0,001
PCC через 6 мес | After 6 months	3,333	1,806–6,147	< 0,001
Самочувствие нарушено (самооценка) | Well-being is impaired (self-assessment)			
через 1 мес | after 1 months	1,756	2,112–1,068	0,015
через 6 мес | after 6 months	1,824	1,157–2,872	0,009
Головная боль через 1 мес | Headache after 1 months			
через 1 мес | after 1 months	2,809	1,614–4,889	< 0,001
через 6 мес | after 6 months	3,274	1,831–5,795	< 0,001
Слабость, утомляемость, нарушение двигательной активности Weakness, fatigue, locomotor activity			
через 1 мес | after 1 months	2,440	1,551–3,838	< 0,001
через 6 мес | after 6 months	2,472	1,527–4,007	< 0,001
Психоэмоциональные расстройства | Psychoemotional disorders			
через 1 мес | after 1 months	3,447	1,774–7,007	< 0,001
через 6 мес | after 6 months	2,918	1,596–5,333	< 0,001
Симптомы СВД (любые признаки) через 1 мес Autonomic dysfunction (any signs) after 1 month	3,387	2,076–5,474	< 0,001
в том числе у детей ≥ 12 лет | including children ≥ 12 years	1,718	1,070–2,759	0,024
Симптомы СВД (любые признаки) через 6 мес Autonomic dysfunction (any signs) after 6 months	3,187	1,917–5,296	< 0,001
Шансы повышены у повторно болевших ОРВИ вне зависимости от группы COVID-19/ОРВИ Odds are increased in children with repeated ARTI regardless of the COVID-19/ARTI group			
Когнитивная дисфункция через 6 мес | Cognitive dysfunction after 6 months	1,745	1,023–2,977	0,041
СВД по ваготоническому типу через 6 мес Vagotonic autonomic dysfunction after 6 months	1,788	1,007–3,171	0,047
Симптомы СВД (любые признаки) через 6 мес Autonomic dysfunction (any signs) after 6 months	1,768	1,181–2,649	0,006

Примечание: *ОШ были повышены во всех временны́х точках контакта, для удобства приведены только точки 1 и 6 мес.
Note: *At all time points of contact, odds were increased for these signs only points of 1 and 6 months are given for convenience.

4,2–38,7); ОР = 1,13 (95% ДИ 0,13–3,03), ОШ = 2,9 (95% ДИ 1,20–6,98); p = 0,018). В более поздние сроки возрастных отличий не установлено.

Риск симптомокомплекса PCC у пациентов ≥ 6 лет, не болевших острыми инфекциями или другими установленными заболеваниями, был выше после COVID-19, чем после ОРВИ, в течение 1 мес, а риск PCC *de novo* был выше только в момент выписки из стационара (p = 0,039). Далее статистической разницы по этому показателю не получено. Через 6 мес наблюдения случаи PCC *de novo* у детей ≥ 6 лет практически отсутствовали (рисунок, *б*).

Множественные и устойчивые (в течение всего года) нарушения, существенно влияющие на

самочувствие, значительно чаще встречались у детей с отягощённым по СВД анамнезом, чем возникали *de novo* (группа COVID-19: 26,5% против 1,1% соответственно; $p < 0,001$; группа ОРВИ — 21,4 и 2,2% соответственно; $p = 0,016$). В **табл. 3** представлены сОШ рисков основных кластеров симптомов, скорректированные по возрасту, отягощённому по СВД анамнезу и повторным эпизодам ОРВИ.

Из табл. 3 видно, что шансы жалоб после COVID-19 были повышены в сравнении с ОРВИ только в момент выписки из стационара, особенно у детей ≥ 12 лет, но через 6 мес шансы были более высокими в группе ОРВИ. Оказалось, что не этиология исходной респираторной инфекции, а именно СВД в анамнезе значительно увеличивал риски доминирующих симптомов во всех точках телефонного контакта. У подростков ≥ 12 лет такие риски были более высокими, чем у детей < 12 лет, если до исходного заболевания регистрировался СВД (сОШ = 3,2; 95% ДИ 2,0–5,2; $p < 0,001$). Интересно, что повторные респираторные эпизоды повышали шансы наиболее значимых кластеров (СВД, в том числе по ваготоническому типу и когнитивных расстройств) к 6 мес наблюдения вне зависимости от этиологии исходной инфекции.

Обсуждение

Согласно последним данным, PCC у детей характеризуется несколькими группами признаков/состояний [1, 24]. После тяжёлых форм COVID-19 и у коморбидных пациентов PCC диагностируется чаще и оказывает более существенное влияние на детское здоровье [1, 3, 25]. Настоящая работа представляет собой попытку объяснить гетерогенность клинических проявлений и временно́й динамики PCC.

В целом мы получили информацию о распространённости, спектре и динамике симптомов, совпадающую с большинством опубликованных систематических обзоров и метаанализов [1, 4, 7, 8]. Симптомы, выявленные при анкетировании, встречались с частотой 32–39%. Наиболее распространёнными были психоэмоциональный кластер и кластер СВД, хотя дети старшего возраста более детально обозначали ощущаемые симптомы, что естественно. Существенную долю составлял респираторный кластер, нередко единственный.

В целом пациенты из групп COVID-19 и ОРВИ испытывали одинаковые симптомы. «Грубая» (нескорректированная по возможным искажающим факторам) оценка отличий группыы COVID-19 от SARS-CoV-2-отрицательной группы обнаружила более высокие риски нарушений самочувствия (дополнительно у детей < 6 лет — проблемы со сном, а у детей ≥ 6 лет — гипосмия и кластер СВД) только в периоде ранней реконвалесценции. Разница по большинству конкретных признаков отсутствовала, что, вероятно, связано с исключением коморбидных пациентов. Мы подтвердили увеличение распространённости некоторых симптомов среди детей старшей возрастной группы (особенно ≥ 12 лет), описанную ранее [12].

В настоящем исследовании наблюдалась различная динамика отдельных симптомов (неоднородные сроки появления и длительность), отмеченная и другими авторами [14–16]. После COVID-19 общее число жалоб последовательно снижалось параллельно повышению среднего балла личностной оценки состояния здоровья. У детей < 6 лет статистическая динамика отдельных кластеров отсутствовала, а у детей ≥ 6 лет частота гипосмии, кластеров утомляемости и СВД (сердечно-сосудистых вегетативных симптомов и СВД по ваготоническому типу) существенно уменьшилась в течение года. В группе ОРВИ сумма негативных субъективных ощущений наросла к 3–6 мес в ассоциации со значительной частотой повторных эпизодов респираторных инфекций: у детей < 6 лет за счёт психоэмоционального кластера, у пациентов ≥ 6 лет — за счёт кластеров когнитивного, усталости и ваготонического СВД. Средний оценочный балл состояния здоровья в группе ОРВИ практически не менялся. На протяжении всего года большинство пациентов обеих групп испытывало лёгкие нарушения здоровья, и их продолжительность не превышала 3–6 мес.

Ещё на ранних этапах пандемии исследователи отметили значительное сходство PCC с клиническими проявлениями дисфункции ВНС [6, 26]. До распространения COVID-19 было показано, что синдром постуральной ортостатической тахикардии, основными клиническими признаками которого являются головокружение, тахикардия, головная боль и трудности с концентрацией внимания, наиболее часто возникает в молодом возрасте с медианой 14 лет и диагностируется со значительным опозданием у большинства пациентов [27]. Принимая во внимание эти данные, мы сосредоточились на определении разницы распространённости симптомов PCC у детей и подростков, имевших и не имевших подобные состояния до COVID-19, что, на наш взгляд, является сильной стороной исследования.

У детей < 6 лет СВД в анамнезе регистрировался редко, поэтому возможности углублённого анализа по этому признаку были ограничены. В старшей возрастной группе расчёт сОШ с поправкой на возраст и историю СВД в прошлом значительно сузил диапазон и размер эффектов COVID-19. Группа COVID-19 отличалась от SARS-CoV-2-отрицательного контроля только в момент выписки из больницы повышенными рисками жалоб на плохое самочувствие. В других временны́х точках частота симптомов ассоциировалась не с этиологией исходной респираторной инфекции (COVID-19 или

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-617

ОРВИ), но именно с историей дисфункции ВНС до пандемии. Среди пациентов без истории аналогичных симптомов и не болевших в течение года PCC *de novo* был редким явлением (2,7–8,0%) без статистических отличий между группами COVID-19 и ОРВИ. Суммарно (вне зависимости от исходной инфекции) множественные (5–25) и устойчивые (во всех индексных точках) симптомы, оценённые пациентами как существенные, возникали *de novo* ещё реже — в 1,7% случаев (95% ДИ 0,4–4,9), но значительно чаще среди детей с СВД в анамнезе — 25% случаев (95% ДИ 13,6–39,6%; разница 23,3% (10,9–35,7%), ОР = 14,8 (4,4–50,6); $p < 0,001$). Представляется, что риски PCC у большинства пациентов были обусловлены исходным состоянием физического и психического здоровья, а личностное восприятие стрессовой ситуации в условиях текущей пандемии играло весомую роль в качестве поддерживающего триггера симптомов. Вместе с тем некоторые пациенты действительно ощущали себя больными, о чём свидетельствовали частые обращения к врачу.

Несмотря на то что взаимосвязанный с COVID-19 педиатрический СВД изучен недостаточно, представлены убедительные биомаркеры дисбаланса ВНС как в остром периоде инфекции, так и после неё [28–30]. R. Buchhorn показал, что данные вариабельности сердечного ритма после COVID-19 существенно не отличаются от таковых у подростков с вегетативной дисфункцией, возникшей из-за психосоматических заболеваний до пандемии COVID-19 [31]. Исследование B.H. Shaw и соавт., проведённое незадолго до пандемии COVID-19, продемонстрировало различные триггеры дисавтономии со значительным преобладанием инфекции (41%) и психологических проблем (28%). Пубертатный период развития ребёнка также отмечен в качестве важного предиктора СВД. Интересно, что в этом исследовании 40% пациентов сообщили о начале симптомов через 3 мес после инициирующего события [27]. Дисбаланс ВНС описан и при других респираторных вирусных инфекциях, например при гриппе [32] или респираторно-синцитиальной инфекции [33].

Косвенное подтверждение этих данных получено и в настоящей работе, т. к. частота жалоб ваготонического СВД и когнитивного кластера увеличилась через 3–6 мес у SARS-CoV-2-негативных пациентов, которые чаще болели повторными ОРВИ. А поправка на искажающие факторы обнаружила значимую роль повторных респираторных инфекций в увеличении рисков таких жалоб. Углублённые исследования продемонстрировали при COVID-19 вегетативные нарушения с преобладанием парасимпатического тонуса [34], хотя многофакторная генерация симптомов и индивидуальные характеристики пациентов опосредуют сложные механизмы дисбаланса ВНС [30].

Стрессовые события являются важнейшим триггером СВД, особенно у предрасположенных пациентов. Пандемия SARS-CoV-2 на глобальном уровне вызвала значительное ухудшение психического и когнитивного здоровья не только у взрослых, но и у детей, что получило название «коронавирусная тревога» [35–37]. Беспокойство о своём здоровье и здоровье близких, страх, негативное освещение в средствах массовой информации, социальная изоляция и отсутствие физической активности усилили стрессовое давление пандемии. Не только подростки, которые более осознанно реагируют на негативный информационный поток, страдали от устойчивых переживаний. Дети младшего возраста также испытывали субъективную тревогу в ответ на тревожность матери [38, 39]. Пациенты с особыми психологическими потребностями или тревожные на исходном уровне имели повышенную чувствительность к вызовам эпидемиологической ситуации, связанной с распространением SARS-CoV-2 [37, 38]. Чрезмерная озабоченность состоянием здоровья может сохраняться в течение многих месяцев после COVID-19 [40]. У взрослых ожидание симптомов, базовая симптоматическая психологическая нагрузка и сведения о перенесённой коронавирусной болезни, но не серологическое её подтверждение были предикторами ухудшения соматических симптомов [41]. Использование шкал для оценки нейропсихиатрических симптомов и соматизации подтвердили субъективную непереносимость стресса и субъективный когнитивный дефицит у пациентов с PCC [42]. По нашим данным, повторные респираторные эпизоды в условиях продолжающейся пандемии как таковые или в качестве эффекта ноцебо, по-видимому, поддерживали/углубляли чувство страха, тревогу и депрессию.

Результаты нашего исследования поддерживают модель PCC, в которой совокупность симптомов представляет собой действительно переживаемые стойкие соматические симптомы, которые обычно носят функциональный характер и, следовательно, потенциально обратимы. PCC, вероятно, является расстройством с соматическими симптомами и предрасполагающими, провоцирующими и закрепляющими факторами [10].

Таким образом, представляется, что PCC не является уникальным событием, свойственным COVID-19, и, по всей видимости, не может быть нозологической единицей клинического диагноза. По нашим данным, единственной клинической характеристикой SARS-CoV-2-инфекции были хемосенсорные расстройства, которые распространены у детей старшего возраста и подростков (сформулировать свои ощущения в виде жалобы дети младших возрастных групп не способны) и сохраняются долго [43]. Интересно, что изначальная выраженность гипосмии, эмоциональный стресс и депрессия мо-

гут быть факторами риска её персистенции в течение 2 лет [44]. Другие специфичные симптомы для COVID-19 и PCC в сравнении с SARS-CoV-2-негативными пациентами нами не установлены.

Ограничениями данного исследования можно считать сбор информации анкетированием без инструментальных исследований, которые приняты для диагностики СВД и связанных сердечно-сосудистых расстройств. Логично допустить, что матери младших детей и дети старшего возраста, зная о своем заболевании и находясь в условиях стрессового воздействия пандемии, склонны неосознанно искажать истинную картину собственного здоровья, что, вероятно, дополнительно стимулировалось наводящими вопросами анкет. Мы оценивали сведения о повторных эпизодах ОРВИ и повторном тестировании наличия SARC-CoV-2 со слов пациентов, и невозможно точно исключить субъективные ошибки данных, хотя в России в этот период было строго регламентировано тестирование всех пациентов с ОРВИ. Возраст пациентов в группе COVID-19 был немного смещён в сторону детей старше 12 лет, имевших более частые жалобы. Тогда следует предполагать вероятность меньших рисков COVID-19, чем установлено в данной работе. Вместе с тем проспективный тип нашего исследования, исключение факторов (тяжесть заболевания и коморбидность), способных заведомо вызвать смещение данных, учёт выраженности симптомов и их динамической вариабельности, незначительная доля отсева и учёт новых событий (заболеваний) на протяжении периода наблюдения позволяют считать, что полученные данные имеют научную и практическую пользу.

Заключение

Данные о распространённости PCC у детей различаются из-за отсутствия конкретных диагностических критериев, надёжных биомаркеров и существенных ограничений многих проведённых исследований. Настоящая работа представляет собой попытку поиска объяснений структурной и временно́й вариабельности PCC как такового и поэтому была сосредоточена на поисках взаимосвязей симптомов после COVID-19 с исходными функциональными нарушениями и любыми событиями в течение года. Поправка на возраст и историю СВД в прошлом позволила установить редкую распространённость PCC (2,7–8,0%) и отсутствие различий между пациентами с подтверждённой или исключённой молекулярными и серологическими методами SARS-CoV-2-инфекции. Кроме длительно сохраняющейся гипосмии, мы не обнаружили специфичных последствий COVID-19 в сравнении с ОРВИ. В большинстве случаев нарушения были лёгкими и продолжались в течение 3–6 мес. Устойчивые и множественные симптомы, воспринимавшиеся пациентами как серьёзные, обнаруживались у четверти пациентов с СВД в прошлом и только у 1,7% пациентов *de novo*. Результаты исследования показали, что повторные респираторные инфекции в условиях продолжающейся пандемии могут быть значимым триггером новых симптомов, что объясняет описанную ранее временну́ю вариабельность PCC. Учитывая наши и появившиеся в последнее время данные, мы поддерживаем актуальную концепцию, в которой PCC представляет собой соматоформное функциональное расстройство, вероятно, социогенного характера у тревожных на исходном уровне пациентов.

Изучение PCC представляет новые аспекты последствий широко распространённых респираторных вирусных инфекций, поскольку некоторые пациенты действительно нуждаются как в медицинской, так и в психосоциальной реабилитации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Rao S., Gross R.S., Mohandas S., et al. Postacute sequelae of SARS-CoV-2 in children. *Pediatrics*. 2024;153(3):e2023062570. DOI: https://doi.org/10.1542/peds.2023-062570.
2. Stephenson T., Allin B., Nugawela M.D., et al. Long COVID (post-COVID-19 condition) in children: a modified Delphi process. *Arch. Dis. Child.* 2022;107(7):674–80. DOI: https://doi.org/10.1136/archdischild-2021-323624
3. Rao S., Lee G.M., Razzaghi H., et al. Clinical features and burden of post acute sequelae of SARS-CoV-2 infection in children and adolescents. *JAMA Pediatr.* 2022;176(10):1000–9. DOI: https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2022.2800
4. Hua M.J., Butera G., Akinyemi O., Porterfield D. Biases and limitations in observational studies of Long COVID prevalence and risk factors: A rapid systematic umbrella review. *PLoS One.* 2024;19(5):e0302408. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302408
5. Behnood S., Newlands F., O'Mahoney L., et al. Persistent symptoms are associated with long term effects of COVID-19 among children and young people: Results from a systematic review and meta-analysis of controlled studies. *PLoS One.* 2023;18(12):e0293600. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293600
6. Lopez-Leon S., Wegman-Ostrosky T., Ayuzo Del Valle N.C., et al. Long-COVID in children and adolescents: a systematic review and meta-analyses. *Sci. Rep.* 2022;12(1):9950. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-022-13495-5
7. Zheng Y.B., Zeng N., Yuan K., et al. Prevalence and risk factor for long COVID in children and adolescents: A meta-analysis and systematic review. *J. Infect. Public Health.* 2023;16(5): 660–72. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.03.005
8. Schiavo M., Di Filippo P., Porreca A., et al. Potential predictors of long COVID in Italian children: a cross-sectional survey. *Children (Basel).* 2024;11(2):221. DOI: https://doi.org/10.3390/children11020221
9. Ma Y., Deng J., Liu Q., et al. Long-term consequences of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2023;20(2):1613. DOI: https://doi.org/10.3390/ijerph20021613
10. Joffe A.R., Elliott A. Long COVID as a functional somatic symptom disorder caused by abnormally precise prior expectations during Bayesian perceptual processing: a new hypothesis and implications for pandemic response. *SAGE Open Med.* 2023;11:20503121231194400. DOI: https://doi.org/10.1177/20503121231194400

11. Xu Z., Wang W., Zhang D., et al. Excess risks of long COVID symptoms compared with identical symptoms in the general population: a systematic review and meta-analysis of studies with control groups. *J. Glob. Health.* 2024;14:05022. DOI: https://doi.org/10.7189/jogh.14.05022
12. Stephenson T., Pinto Pereira S.M., Shafran R., et al. Physical and mental health 3 months after SARS-CoV-2 infection (long COVID) among adolescents in England (CLoCk): a national matched cohort study. *Lancet Child Adolesc. Health.* 2022;6(4):230–9. DOI: https://doi.org/10.1016/S2352-4642(22)00022-0
13. Luo D., Mei B., Wang P., et al. Prevalence and risk factors for persistent symptoms after COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2024;30(3):328–35. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.10.016
14. Pazukhina E., Andreeva M., Spiridonova E., et al. Prevalence and risk factors of post-COVID-19 condition in adults and children at 6 and 12 months after hospital discharge: a prospective, cohort study in Moscow (StopCOVID). *BMC Med.* 2022;20(1):244. DOI: https://doi.org/10.1186/s12916-022-02448-4
15. Чернявская А.С., Симонова О.И., Каширская Н.Ю. Особенности постковидного синдрома у детей, перенесших инфекцию в легкой форме. *Медицинский совет.* 2023;17(17):187–93. Chernyavskaya A.S., Simonova O.I., Kashirskaya N.Yu. Characteristics of post COVID-19 condition in children after mild COVID-19. *Medical Council*. 2023; 17(17):187–193. DOI: https://doi.org/10.21518/ms2023-386 EDN: https://elibrary.ru/wvozve
16. Stephenson T., Pinto Pereira S.M., Nugawela M.D., et al. Long COVID-six months of prospective follow-up of changes in symptom profiles of non-hospitalised children and young people after SARS-CoV-2 testing: a national matched cohort study (The CLoCk) study. *PLoS One.* 2023;18(3):e0277704. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277704
17. Pinto Pereira S.M., Shafran R., Nugawela M.D., et al. Natural course of health and well-being in non-hospitalised children and young people after testing for SARS-CoV-2: a prospective follow-up study over 12 months. *Lancet Reg. Health Eur.* 2023;25:100554. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2022.100554
18. Pinto Pereira S.M., Nugawela M.D., Rojas N.K., et al. Post-COVID-19 condition at 6 months and COVID-19 vaccination in non-hospitalised children and young people. *Arch. Dis. Child.* 2023;108(4):289–95. DOI: https://doi.org/10.1136/archdischild-2022-324656
19. Исаева Е.П., Зайцева О.В., Локшина Э.Э. и др. Качество жизни детей после перенесенной новой коронавирусной инфекции. *Медицинский совет*. 2023;17(1):198–204. Isaeva E.P., Zaytseva O.V., Lokshina E.E., et al. Quality of life in children after a new coronavirus infection. *Medical Council*. 2023;17(1):198–204. DOI: https://doi.org/10.21518/ms2022-013 EDN: https://elibrary.ru/pduzar
20. Vu T.T., Nguyen K.C., Nguyen H.T., et al. Prevalence and symptom profile of long COVID among schoolchildren in Vietnam. *Viruses*. 2024;16(7):1021. DOI: https://doi.org/10.3390/v16071021
21. Robinson J.L., Le Saux N. Children and long-COVID: Do they go together? *J. Assoc. Med. Microbiol. Infect. Dis. Can.* 2022;7(4):300–6. DOI: https://doi.org/10.3138/jammi-2022-09-26
22. Chaichana U., Man K.K.C., Chen A., et al. Definition of post-COVID-19 condition among published research studies. *JAMA Netw. Open.* 2023;6(4):e235856. DOI: https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.5856
23. Goretzki S.C., Brasseler M., Dogan B., et al. High prevalence of alternative diagnoses in children and adolescents with suspected long COVID — a single center cohort study. *Viruses.* 2023;15(2):579. DOI: https://doi.org/10.3390/v15020579
24. Parzen-Johnson S., Katz B.Z. Navigating the spectrum of two pediatric COVID-19 complications: multi-system inflammatory syndrome in children and post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection. *J. Clin. Med.* 2024;13(4):1147. DOI: https://doi.org/10.3390/jcm13041147
25. Lap C.R., Brackel C.L.H., Winkel A.M.A.M., et al. Post-COVID-19 condition in children: epidemiological evidence stratified by acute disease severity. *Pediatr. Res.* 2024. DOI: https://doi.org/10.1038/s41390-024-03597-3
26. Becker R.C. Autonomic dysfunction in SARS-CoV-2 infection acute and long-term implications COVID-19 editor's page series. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2021;52(3):692–707. DOI: https://doi.org/10.1007/s11239-021-02549-6
27. Shaw B.H., Stiles L.E., Bourne K., et al. The face of postural tachycardia syndrome — insights from a large cross-sectional online community-based survey. *J. Intern. Med.* 2019;286(4):438–48. DOI: https://doi.org/10.1111/joim.12895
28. Woo M.S., Shafiq M., Fitzek A., et al. Vagus nerve inflammation contributes to dysautonomia in COVID-19. *Acta Neuropathol.* 2023;146(3):387–94. DOI: https://doi.org/10.1007/s00401-023-02612-x.
29. Haischer M.H., Opielinski L.E., Mirkes L.M., et al. Heart rate variability is reduced in COVID-19 survivors and associated with physical activity and fatigue. *Physiol. Rep.* 2024;12(2):e15912. DOI: https://doi.org/10.14814/phy2.15912
30. Scala I., Rizzo P.A., Bellavia S., et al. Autonomic dysfunction during acute SARS-CoV-2 infection: a systematic review. *J. Clin. Med.* 2022;11(13):3883. DOI: https://doi.org/10.3390/jcm11133883
31. Buchhorn R. Therapeutic approaches to dysautonomia in childhood, with a special focus on long COVID. *Children (Basel).* 2023;10(2):316. DOI: https://doi.org/10.3390/children10020316
32. Mattei J., Teyssier G., Pichot V., et al. Autonomic dysfunction in 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus-related infection: a pediatric comparative study. *Auton. Neurosci.* 2011;162(1-2):77–83. DOI: https://doi.org/10.1016/j.autneu.2011.03.003
33. Stock C., Teyssier G., Pichot V., et al. Autonomic dysfunction with early respiratory syncytial virus-related infection. *Auton. Neurosci.* 2010;156(1-2):90–5. DOI: https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.03.012
34. Delogu A.B., Aliberti C., Birritella L., et al. Autonomic cardiac function in children and adolescents with long COVID: a case-controlled study. *Eur. J. Pediatr.* 2024;183(5):2375–82. DOI: https://doi.org/10.1007/s00431-024-05503-9
35. Racine N., McArthur B.A., Cooke J.E., et al. Global prevalence of depressive and anxiety symptoms in children and adolescents during COVID-19: A meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2021;175(11):1142–50. DOI: https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.2482
36. Fortuna L.R., Brown I.C., Lewis Woods G.G., Porche M.V. The impact of COVID-19 on anxiety disorders in youth: coping with stress, worry, and recovering from a pandemic. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 2023;32(3):531–42. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chc.2023.02.002
37. Panchal U., Salazar de Pablo G., Franco M., et al. The impact of COVID-19 lockdown on child and adolescent mental health: systematic review. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry.* 2023;32(7):1151–77. DOI: https://doi.org/10.1007/s00787-021-01856-w
38. Terin H., Açıkel S.B., Yılmaz M.M., Şenel S. The effects of anxiety about their parents getting COVID-19 infection on children's mental health. *Eur. J. Pediatr.* 2023;182(1):165–71. DOI: https://doi.org/10.1007/s00431-022-04660-z
39. Hagan M.J., Roubinov D.R., Cordeiro A., et al. Young children's traumatic stress reactions to the COVID-19 pandemic: the long reach of mothers' adverse childhood experiences. *J. Affect. Disord.* 2022;318:130–8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.08.061

40. Horn M., Wathelet M., Amad A., et al. Persistent physical symptoms after COVID-19 infection and the risk of somatic symptom disorder. *J. Psychosom. Res.* 2023;166:111172. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2023.111172
41. Engelmann P., Löwe B., Brehm T.T., et al. Risk factors for worsening of somatic symptom burden in a prospective cohort during the COVID-19 pandemic. *Front. Psychol.* 2022;13:1022203. DOI: https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.1022203
42. Tröscher A., Gebetsroither P., Rindler M., et al. High somatization rates, frequent spontaneous recovery, and a lack of organic biomarkers in post-COVID-19 condition. *Brain Behav.* 2024;14(10):e70087. DOI: https://doi.org/10.1002/brb3.70087
43. Almoznino G., Gleicher D., Kharouba J., Blumer S. Olfactory and gustatory disorders associated with SARS-CoV-2 infection in children and adults: a topic review. *Quintessence Int.* 2023;54(10):852–66. DOI: https://doi.org/10.3290/j.qi.b4313291
44. Liao B., Deng Y.K., Zeng M., Liu Z. Long-term consequences of COVID-19: chemosensory disorders. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2023;23(2):111–9. DOI: https://doi.org/10.1007/s11882-022-01062-x

Информация об авторах

Мескина Елена Руслановна✉ — д-р мед. наук, зав. отд. детских инфекций отдела терапии, профессор каф. детских болезней факультета усовершенствования врачей МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, meskinaelena@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-1960-6868

Хадисова Марима Касумовна — канд. мед. наук, с. н. с. отд. детских инфекций отдела терапии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, murzabekova.marina.1979@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8293-6643

Ушакова Анна Юрьевна — канд. мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней факультета усовершенствования врачей МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, vaoe_08@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8438-7609

Целипанова Елена Евгеньевна — канд. мед. наук, с. н. с. отд. детских инфекций отдела терапии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, elena-tselip@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-0586-8402

Галкина Лидия Алексеевна — канд. мед. наук, с. н. с. отд. детских инфекций отдела терапии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, lidiya140855@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0052-2867

Участие авторов: *Мескина Е.Р.* — идея, дизайн исследования, статистический анализ, редакция рукописи; *Хадисова М.К.* — скрининг пациентов по критериям включения/невключения/исключения, наблюдение за пациентами в стационаре, сбор информации при телефонных контактах, база данных, статистический анализ; *Ушакова А.Ю.* — сбор информации при телефонных контактах, база данных; *Целипанова Е.Е.* — сбор информации при телефонных контактах, подготовка текста рукописи, наглядные материалы (таблицы, рисунки); *Галкина Л.А.* — сбор информации при телефонных контактах, подготовка текста 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 04.10.2024;
принята к публикации 28.12.2024;
опубликована 28.02.2025

Information about the authors

Elena R. Meskina✉ — Dr. Sci. (Med.), Head, Children's infectious disease department, Professor, Chair of children's diseases, Postgraduate training faculty, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, meskinaelena@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-1960-6868

Marima K. Khadisova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Children's infectious disease department, Therapy department, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, murzabekova.marina.1979@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8293-6643

Anna Yu. Ushakova — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of infectious diseases, Postgraduate training faculty, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, vaoe_08@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8438-7609

Elena E. Tselipanova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of children's infections, Therapy department, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, elena-tselip@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-0586-8402

Lidiya A. Galkina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of children's infections, Therapy department, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, lidiya140855@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0052-2867

Authors' contribution: *Meskina E.R.* — idea, study design, statistical analysis, manuscript revision; *Khadisova M.K.* — screening of patients according to inclusion/non-inclusion/exclusion criteria, observation of patients in hospital, collection of information during telephone contacts, database, statistical analysis; *Ushakova A.Yu.* — collection of information on telephone contacts, database; *Tselipanova E.E.* — collection of information by telephone contacts, preparation of manuscript text, visual materials (tables, drawings); *Galkina L.A.* — collection of information through telephone contacts, preparation 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 04.10.2024;
accepted for publication 28.12.2024;
published 28.02.2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-544
ORIGINAL RESEARCHES

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-544

Сравнительный геномный анализ клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса в неонатальном периоде

Устюжанин А.В.✉, Маханёк А.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И.

Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества, Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Существует необходимость исследования генетического разнообразия внутрибольничных штаммов, распространённости детерминант устойчивости к антибиотикам, факторов вирулентности и реализации патогенного потенциала оппортунистическими микроорганизмами.

Цель работы — сравнить генетический профиль антибиотикорезистентности и вирулентности клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса в неонатальном периоде.

Материалы и методы. С помощью полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа для поиска детерминант резистентности и вирулентности исследованы 3 штамма *K. pneumoniae*, 2 из которых выделены из крови при генерализованной инфекции, 1 — из фекалий новорождённого ребёнка.

Результаты. *K. pneumoniae* ST23, ST14, ST3559 отличались генетическими детерминантами антибиотикорезистентности и факторов вирулентности. Вместе с тем все они имели гены *fimH*, *mrkA* и *iutA*, ассоциированные с повышенной способностью к адгезии к субстратам и транспортом аэробактина. Штамм ST3559, обладающий наибольшим количеством генов антибиотикорезистентности (9), содержал 8 генов факторов вирулентности; в штамме ST23, в котором детектировано наименьшее количество генов устойчивости к антибактериальным препаратам (3), обнаружено больше всего генов факторов вирулентности (21).

Заключение. Выявление штаммов *K. pneumoniae*, различающихся по генетическому профилю антибиотикорезистентности и вирулентности, у пациентов неонатальных стационаров указывает на сложное взаимодействие между бактериями и организмом новорождённого ребёнка, при котором изоляты с низким патогенным потенциалом могут вызывать серьёзные инфекционные осложнения, и наоборот, когда высоковирулентный штамм не реализует свой патогенный потенциал, как в случаях с *K. pneumoniae* ST14, ST3559 и ST23. Это подчёркивает сложность эффективного прогнозирования и управления инфекционными рисками в деятельности стационаров.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae, полногеномное секвенирование, биоинформационный анализ, гены вирулентности, гены антибиотикорезистентности*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИ охраны материнства и младенчества (протокол № 15 от 06.12.2022).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Для цитирования: Устюжанин А.В., Маханёк А.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Сравнительный геномный анализ клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса в неонатальном периоде. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):62–71.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-544
EDN: https://www.elibrary.ru/zxmnbq

© Устюжанин А.В., Маханёк А.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-544

Comparative genomic analysis of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborns with different outcomes of the infectious process in the neonatal period

Alexander V. Ustyuzhanin✉, Anna A. Makhanyok, Guzel N. Chistyakova, Irina I. Remizova

Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Some progress has been made in the study of the molecular mechanisms of antibiotic resistance, namely, genes and their variants have been identified that ensure the inactivation of beta-lactam antibiotics. Nevertheless, there is still a necessity for further studies of genetic diversity of nosocomial strains, prevalence of genetic determinants of resistance to other groups of antibiotics, virulence factors and realization of pathogenic potential by opportunistic microorganisms.

Aim of the study was to compare the genetic profile of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborns with different outcomes of the infectious process in the neonatal period.

Materials and methods. Using whole-genome sequencing and bioinformatic analysis to search for determinants of resistance and virulence, 3 strains of *K. pneumoniae* were studied, 2 of which were isolated from the blood of a generalized form of infection, 1 from the feces of a newborn child.

Results. *K. pneumoniae* strains belonged to sequence types (ST) ST23, ST14 and ST3559, and differed in genetic determinants of antibiotic resistance and virulence factors. At the same time, they all had the genetic determinants *fimH*, *mrkA* and *iutA*, which are associated with an increased ability to attach to substrates and transport aerobactin. Strain 222 of ST3559, which has the largest number of antibiotic resistance genes, contained the smallest number of virulence factor genes, and vice versa, strain 144 of ST23, in which the smallest number of antibacterial drug resistance genes was detected, contained the most virulence factor genes.

Conclusions. Identification of *K. pneumoniae* strains that differ in the genetic profile of antibiotic resistance and virulence in neonatal hospital patients indicates a complex interaction between bacteria and the macroorganism, in which isolates with low pathogenic potential can cause serious infectious complications, and vice versa, when a highly virulent strain does not realize its pathogenic potential, as demonstrated in case of *K. pneumoniae* strains ST14, ST3559 and ST23, respectively. This highlights the difficulty of effectively predicting and managing infection risks in hospital operations.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae, next-generation sequencing, bioinformatics analysis, virulence genes, antibiotic resistance genes*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent the legal representatives of patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care (protocol No. 15, December 6, 2022).

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

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

For citation: Ustyuzhanin A.V., Makhanyok A.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I. Comparative genomic analysis of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborns with different outcomes of the infectious process in the neonatal period. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):62–71.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-544
EDN: https://www.elibrary.ru/zxmnbq

Введение

Klebsiella pneumoniae является типичным представителем энтеробактерий, который может быть обнаружен при бессимптомной колонизации слизистых оболочек нестерильных биотопов человеческого организма [1]. Вместе с тем *K. pneumoniae* включена в пятёрку основных этиологических агентов, ассоциированных с инфекционными процессами с летальным исходом во всём мире, вне зависимости от антибиотикочувствительности изолята [2]. По данным результатов многоцентрового эпидемиологического исследования в России, *K. pneumoniae* — наиболее распространённый бактериальный возбудитель внутрибольничных инфекций дыхательной (35,81%) и мочевыделительной (31,94%) систем, сердца и сосудов (26,40%), инфекций центральной нервной системы (ЦНС; 27,78%), занимает 2-е место среди возбудителей нозокомиальных инфекций кожи и мягких тканей (19,10%), брюшной полости (26,26%) и инфекций костей и суставов (15,93%) [3].

© Ustyuzhanin A.V., Makhanyok A.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., 2025

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-544

Среди энтеробактерий, которые являются этиологическими агентами осложнений инфекционного генеза у новорождённых в отделении реанимации, *K. pneumoniae* регистрируется в 48% случаев [4]. В этиологически значимом титре у детей, находящихся на лечении в условиях стационара Кемеровской области, чаще всего она была обнаружена в образцах фекалий (826,41 на 1000 пациентов) и отделяемого глотки (33,96 на 1000 пациентов) [5]. В педиатрическом стационаре Нижнего Новгорода эпидемиологическое неблагополучие связывают со штаммом *K. pneumoniae* ST3181, первоначально выделенным в Австралии и впервые описанным в России [6].

K. pneumoniae — 3-я по частоте встречаемости среди этиологических агентов инфекций кровотока после *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативных стафилококков в педиатрических отделениях Республики Беларусь, где она регистрируется в 14,6% случаев [7].

В других странах, где показатель смертности от генерализованных инфекций кровотока регистрируется на уровне 18–68%, *K. pneumoniae* является также одним из значимых патогенов, обнаруживаемых у новорождённых, госпитализированных в отделения интенсивной терапии [8].

При анализе генетических вариантов установлено, что в одном из детских стационаров Москвы штаммы *K. pneumoniae* относились к 4 сублиниям: SL307, SL395, SL29 и SL1198, что свидетельствует о гетерогенности популяции штаммов и возможном присутствии в условиях педиатрического отделения сразу нескольких вариантов одного вида бактерий [9].

Выявление генов устойчивости ко всем категориям антибиотиков, рекомендованных для терапии *Enterobacteriaceae*, в геномах 6 панрезистентных штаммов ещё раз подтверждает актуальность проблемы поиска препаратов для эффективной антибиотикотерапии. В Марокко при активном выявлении ректального носительства у новорождённых установлено, что из 293 собранных изолятов *K. pneumoniae* № 91 (31,05%) продуцировал карбапенемазу. Среди карбапенем-устойчивых *K. pneumoniae* № 37 (40,65%) содержал ген bla_{OXA-48}, а bla_{NDM}, bla_{VIM} и bla_{KPC} были обнаружены у 30,76, 9,89 и 2,19% изолятов соответственно [10]. К глобально распространённым сиквенс-типам с множественной лекарственной устойчивостью относятся ST14/15, ST17/20, ST43, ST147, ST258, ST395 [11], при этом последний, часто встречающийся в педиатрических стационарах, ассоциирован с устойчивостью к колистину [12]. Обращает на себя внимание детекция конвергентных типов. Так, в 2 больницах Санкт-Петербурга госпитальные вспышки были вызваны устойчивыми к карбапенемам гипервирулентными штаммами [13]. В Москве детектирован ST395, сочетающий в себе признаки как антибиотикорезистентного, так и вирулентного микроорганизма, способного к диссеминации в человеческом организме [9]. Исходя из вышеизложенного, *K. pneumoniae* является актуальным условно-патогенным микроорганизмом, связанным с возникновением как внутри-, так и внебольничных инфекций. Причиной тому является высокая скорость передачи генетических детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности на мобильных генетических элементах, формирование патогенных и/или антибиотикоустойчивых эпидемически значимых клональных линий и их распространение среди пациентов всего мира [9].

Перинатальные центры не являются исключением и логично вписываются в систему оказания медицинской помощи на стационарном этапе, концентрируя в своих стенах контингент с ограниченными терапевтическими возможностями и высоким риском развития инфекционно-воспалительных процессов, вызванных условно-патогенными микроорганизмами. Это связано с морфофункциональной незрелостью различных органов и их систем у детей, рождённых маловесными и/или от ранних и сверхранних преждевременных родов [14].

В изучении молекулярных механизмов антибиотикорезистентности достигнуты успехи: определены гены и их варианты, обеспечивающие инактивацию антибактериальных препаратов, установлена связь с определёнными клональными группами. Тем не менее в настоящее время сохраняется необходимость проведения дальнейших исследований генетического разнообразия внутрибольничных штаммов, распространённости генетических детерминант устойчивости к антибиотикам, факторов вирулентности и реализации патогенного потенциала оппортунистическими микроорганизмами.

Цель исследования — сравнить генетический профиль антибиотикорезистентности и вирулентности клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса в неонатальном периоде.

Материал и методы

Исследованы 3 штамма *K. pneumoniae*, 2 из которых выделены из крови при позднем госпитальном неонатальном сепсисе, 1 — из фекалий ребёнка при проведении локального микробиологического мониторинга[1]. При этом следует отметить, что в 1 случае инфекция кровотока закончилась летально, в другом — выздоровлением. Штаммы выделе-

[1] Приказ ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России № 263-п от 26.06.2016 о порядке микробиологического мониторинга.

ны 05.04.2023, 11.10.2023, 26.02.2024 и сохранены в рабочей коллекции лаборатории микробиологии. Нуклеотидные последовательности депонированы в международной базе генетической информации GenBank (БиоПроект: PRJNA1144786, номера в GenBank: JBGKAX000000000, JBGKAY000000000, JBHILO000000000). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов и одобрено локальным этическим комитетом НИИ охраны материнства и младенчества (протокол № 15 от 06.12.2022).

Сбор крови в объёме до 4 мл из интактной вены осуществляли в педиатрический флакон непосредственно у постели больного с последующим культивированием в анализаторе «BacT/ALERT» («bioMerieux»).

Высев положительной гемокультуры и посев фекалий производили на питательные среды: Эндо, дифференциально-диагностическая лактозосодержащая питательная среда (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии), а также на кровяно-сывороточный агар (основа — «Conda»).

Видовую идентификацию бактерии и определение чувствительности к антибактериальным препаратам (ампициллин, амоксициллин + клавулановая кислота, цефотаксим, цефтазидим, цефепим, эртапенем, меропенем, амикацин, гентамицин, ципрофлоксацин, тайгециклин, фосфомицин, нитрофурантоин, триметоприм сульфаметоксазол, колистин) проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе «VITEK 2 compact» («Bio Mérieux») в Центре коллективного пользования «Инновационный научно-лабораторный центр перинатальной и репродуктивной медицины») с использованием карт «VITEK 2 GN» (идентификация) и «AST-N360» (определение антибиотикочувствительности).

Для оценки плёнкообразующей способности бактерий пользовались методикой, описанной ранее [15].

Тотальную ДНК выделяли из 24-часовой культуры с применением наборов «D-Cells-10» (ООО «Биолабмикс»). Секвенирование штамма 222 и 56 выполняли на платформе «MiSeq» («Illumina»), 144 — на «SURFSeq 5000» («GeneMind»). Качество прочтений оценивали с помощью программного инструмента «FastQC» [16]. Сборку геномов *de novo* проводили с помощью midsystem [17]. Мультилокусное сиквенс-типирование осуществляли по методике, предложенной сотрудниками Института Пастера [18]. Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК 7 генов домашнего хозяйства: *rpoB, gapA, mdh, pgi, phoE, infB, tonB* и других локусов генома *K. pneumoniae* проводили с использованием базы данных BIGSdb-Pasteur[2] Института Пастера.

Поиск генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности осуществляли с использованием онлайн-сервисов: VirulenceFinder[3] и ResFinder[4]. Типирование капсульных локусов (K-локусы) осуществляли с помощью сайта Kaptive[5] [19].

Для проведения сравнительного анализа полученных нами последовательностей использовали данные GenBank NCBI.

Гиперпродукцию слизи определяли с помощью методики [20].

Результаты

Краткая характеристика пациентов

Штамм *K. pneumoniae* № 222 был выделен из положительной гемокультуры пациента П. на 49-е сутки жизни. Его выявлению из образца крови при клинически выраженной генерализованной инфекции предшествовала 10-дневная колонизация кишечника *K. pneumoniae*, установленная с помощью локального микробиологического мониторинга.

K. pneumoniae № 56, обнаруженная у пациента М., первоначально была выделена из пробы фекалий на 35-е сутки жизни при проведении локального микробиологического мониторинга. Из соматической патологии следует отметить наличие гипоксии ЦНС при рождении и внутриутробных пороков развития ЦНС и сердечно-сосудистой системы, которые усугубили состояние ребёнка в неонатальном периоде. В возрасте ребенка 43 сут *K. pneumoniae* в монокультуре была выделена уже из содержимого его трахеобронхиального дерева и из положительной гемокультуры при отрицательной динамике клинического состояния новорождённого, что подтверждает транслокацию штамма через стенку кишки и его диссеминацию по организму. На 44-е сутки наступил летальный исход, и при бактериологическом исследовании секционного материала (кровь из полости сердца, ткань кишечника, лёгких, печени) *K. pneumoniae* в монокультуре была выделена из всех образцов перечисленного биологического материала без сопутствующих микроорганизмов.

Штамм *K. pneumoniae* № 144 выделен при локальном микробиологическом мониторинге отделения новорождённых недоношенных детей из фекалий пациента Ш. (дата рождения 21.02.2024) на 6-е сутки его жизни (гестационный возраст 36,5 нед, масса тела 2650 г, оценка по шкале Апгар 5/7 на 1-й и 7-й минутах жизни). В течение всего неонатального периода ребёнка в условиях стационара результаты лабораторных исследований были

[2] URL: https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella

[3] URL: https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder
[4] URL: https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder
[5] URL: https://kaptive-web.erc.monash.edu

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-544

без признаков воспалительного процесса. После выписки в удовлетворительном состоянии домой на 15-е сутки жизни в течение 3 мес семья не обращалась за медицинской помощью, что свидетельствует об отсутствии инвазивных инфекционных процессов. Их реализация определяется как способностью иммунологических реакций своевременно распознавать антиген и обеспечивать поддержание антигенного гомеостаза, так и морфологической характеристикой и фенотипическими свойствами бактериального агента.

Фенотипическая характеристика штаммов

Показатели оптической плотности, полученные при изучении плёнкообразующей способности штаммов, сведения о гиперпродукции слизи, формы и исходы нозологий, другие метаданные отражены в **табл. 1**.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, изучаемые штаммы были выделены из образцов биологического материала с интервалом в несколько месяцев. У всех пациентов отмечена колонизация кишечного биотопа, у 2 из них зарегистрирована генерализация инфекционного процесса. При этом у 1 из них она закончилась летально. Гиперпродукция слизи, отмеченная у 1 из 3 штаммов, ассоциирована с повышенной способностью к плёнкообразованию.

Одним из значимых свойств бактериальных штаммов, в том числе для врачей клинических специальностей, является чувствительность к антибиотикам.

Минимальные подавляющие концентрации антибактериальных препаратов штаммов № 222 и 56 представлены в **табл. 2**. Штамм № 144 был чувствительным ко всем протестированным антибиотикам, кроме ампициллина.

Штаммы, выделенные из положительной гемокультуры, выработали резистентность к защищённому амоксициллину (табл. 2). Штамм № 222 проявлял множественную лекарственную устойчивость и продуцировал бета-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС). Сформировав резистентность к одному из аминогликозидов (гентамицин), ципрофлоксацину и хлорамфениколу, он сохранил чувствительность к колистину, фосфомицину, амикацину и антибиотикам из группы карбапенемов (эртапенем и меропенем).

Генетические детерминанты антибиотикорезистентности, обусловливающие фенотипическую устойчивость к антибиотикам, наряду с генами факторов вирулентности, внешних и внутренних структур бактериальных клеток, позволяют получить больше информации для проведения глубокого анализа данных о микроорганизмах.

Генетическая характеристика штаммов

Как видно из представленных в **табл. 3** данных, изучаемые штаммы принадлежат трем ST: ST3559, ST14, ST23.

Штамм № 222, ST3559 относится к клональной группе CG429, являясь вариантом сублинии ST429, распространённой на всех континентах [21]. Этот штамм имеет 1 балл при оценке вирулентности за счёт наличия гена *ybt* и 1 балл при оценке его устойчивости к антибактериальным препаратам в связи с генами БЛРС.

Штамм № 56, ST14 регистрируется в качестве этиологического агента неонатального сепсиса в центральной Италии [22], Турции [23], Вьетнаме

Таблица 1. Метаданные и фенотипическая характеристика штаммов *K. pneumoniae*
Table 1. Metadata and phenotypic characterization of *K. pneumoniae* strains

Показатель | Parameter	Штамм 222 | Strain 222	Штамм 56 | Strain 56	Штамм 144 | Strain 144
Дата обнаружения | Date of discovery	05.04.2023	11.10.2023	26.02.2024
Пациент | Patient	П. | P.	М. | M.	Ш. | Sh.
Колонизация кишечника *K. pneumoniae,* предшествующая инфекционному процессу Colonization of the intestine with *K. pneumoniae* preceding the infectious process	Да Yes	Да Yes	Да Yes
Нозологическая форма Nosological form	Генерализованная инфекция Generalized infection	Генерализованная инфекция Generalized infection	Носительство (колонизация кишечного биотопа) Carriage (colonization of the intestinal biotope)
Исход нозологической формы Outcome	Выздоровление Recovery	Летальный исход Death	Носительство (колонизация кишечного биотопа) Carriage (colonization of the intestinal biotope)
Формирование биоплёнки, оптическая плотность, нм Biofilm formation, optical density, nm	0,235	0,045	0,555
Гиперпродукция слизи Hyperproduction of mucus	Нет No	Нет No	Да Yes

Таблица 2. Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* № 55 и 222 к антибактериальным препаратам
Table 2. *K. pneumoniae* strains No.56 and 222 sensitivity to antimicrobial drugs

Антибиотик Antibiotic	Штамм 222 | Strain 222		Штамм 56 | Strain 56	
	минимальная подавляющая концентрация, мг/л minimum inhibitory concentration, mg/L	чувствительность sensitivity	минимальная подавляющая концентрация, мг/л minimum inhibitory concentration, mg/L	чувствительность sensitivity
Ампициллин | Ampicillin	≥ 32	–	≥ 32	–
Амоксициллина клавуланат Amoxicillin clavulanate	≥ 32	–	≥ 32	–
Цефотаксим | Cefotaxime	≥ 64	–	≤ 0,25	+
Цефтазидим | Ceftazidime	32	–	16	–
Цефепим | Cefepime	≥ 32	–	≤ 0,12	+
Эртапенем | Ertapenem	≤ 0,12	+	≤ 0,12	+
Меропенем | Meropenem	≤ 0,25	+	≤ 0,25	+
Амикацин | Amikacin	4	+	≤2	+
Гентамицин | Gentamicin	≥ 16	–	≤ 1	+
Ципрофлоксацин | Ciprofloxacin	1	–	≤ 0,25	+
Фосфомицин | Fosfomycin	≤ 16	+	≤ 16	+
Триметоприм | Trimethoprim	≥ 320	–	≤ 0,20	+
Колистин | Colistin	≤ 0,5	+	≤ 0,5	+

[14], Индии [24] и Танзании [25], что подтверждает его широкую распространённость в педиатрических отделениях.

Штамм № 144, ST23 принадлежит к гипервирулентной клональной группе CG23, сублинии SL23. Он охарактеризован на 5 баллов из 5 при оценке вирулентности за счёт наличия генов, кодирующих синтез колибактина (*clb1*), аэробактина (*iuc1*), и иерсиниабактина (*ybt*). Это наиболее вирулентный штамм из сравниваемых нами в настоящем исследовании.

Обсуждение

Штаммы № 56 и 222 фенотипически отличались чувствительностью к антибиотикам. Интересно отметить, что штамм № 56 был резистентным к цефтазидиму, сохраняя чувствительность к цефепиму и цефотаксиму, хотя в ходе предшествующих работ нами было установлено, что все БЛРС-продуцирующие штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в период с 01.01.2020 по 31.12.2021, были устойчивыми к цефотаксиму и обладали геном $bla_{\text{CTX-M}}$ [26].

Штаммы, включённые в настоящее исследование, принадлежали разным сиквенс-типам, капсульным вариантам, имели отличающиеся наборы генов факторов вирулентности и устойчивости к антибактериальным препаратам. Вместе с тем их объединяет наличие генетических детерминант *fimH*, *mrkA* и *iutA*. Гены *fimH, mrkA* ассоциированы с повышенной способностью к прикреплению к субстратам, *iutA* — с транспортом аэробактина [1]. Все штаммы имели ген bla_{SHV}, свойственный для *K. pneumoniae* как вида, обеспечивающий природную резистентность к ампициллину. Мутации в указанном гене меняют субстратную специфичность и способствуют инактивации более широкого спектра антибактериальных препаратов. Выявленные в изучаемых штаммах аллели $bla_{\text{SHV-11}}$, $bla_{\text{SHV-1}}$, $bla_{\text{SHV-90}}$ широко распространены в России и были обнаружены в штаммах, выделенных в Москве в 2012–2016 гг. [27]. Ген $bla_{\text{SHV-90}}$, идентифицированный в штамме ST23, как и гены *fosA, oqxA, oqxB*, аналогичны генетическим детерминантам, охарактеризованным в подавляющем большинстве штаммов, выделенных в Китае и вызвавших как вне-, так и внутрибольничные инфекции [28].

Штаммы *K. pneumoniae* с гиперпродукцией слизи, обладающие большим патогенным и эпидемиологическим потенциалом, в настоящее время являются актуальной проблемой для системы здравоохранения многих стран, поэтому своевременная детекция таких бактериальных вариантов весьма актуальна для принятия решения по тактике ведения пациента и реализации противоэпидемиологических мероприятий [29].

От новорождённых перинатального центра были выделены как классические штаммы, продуцирующие БЛРС, так и изолят с гипермукоидным фенотипом, принадлежащий эпидемиологически значимому гипервирулентному ST23. *K pneumoniae* ST23 выделяется преимущественно в Азии, включая Тайвань, Сингапур и материковый Китай [28], и именно с ним связаны первые описания гипервирулентных клебсиелл. Хорошо изучен-

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-544

Таблица 3. Сравнительная генетическая характеристика штаммов, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса

Table 3. Comparative genetic characteristics of strains isolated from newborns with different outcomes of the infectious process

Показатель | Parameter	Штамм 222 | Strain 222	Штамм 56 | Strain 56	Штамм 144 | Strain 144
Размер генома, п. н. | Genome size, bp	5 414 099	5 544 559	5 468 329
GC состав, % | GC composition, %	57,3	57,1	57,4
ST	3559	14	23
KL-тип | KL type	KL27	KL2	KL1
O-локус | O locus	O4	O1/O2v1	O3/O3a
O-тип | O type	O4	O1	O3/O3a
Количество генов | Number of genes	5299	5311	5176
Количество контигов Number of contigs	101	89	79
Гены антибиотикорезистентности Antibiotic resistance genes	*aac (6')-Ib-cr* *bla* $_{CTX-M-15}$ *bla* $_{SHV-11}$ *bla* $_{TEM-1B}$ *fosA6* *oqxA,B* *blaOXA-1* *catB3* *dfrA1*	*bla* $_{SHV-1}$ *fosA* *oqxA,B* *tet(D)* *catA1*	*bla* $_{SHV-190}$ *fosA6* *oqxA,B*
Гены вирулентности Virulence genes	*fimH,* *iutA,* *traT* *fyuA* *irp1, 2* *kfuA, B* *mrk A, B, C, D, F, H, I, J* *ybt A, E, P, Q, S, T, U, X*	*fimH,* *iutA* *traT* *kfuA, B, C* *mrkA, B, C, D, F,* *H, I, J*	*fimH,* *iutA* *mchF* *allA, B, C, D, R, S* *arcC* *clbA, B, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, O, P, Q, R* *fdrA* *fyuA* *gcl* *glxK, R* *hyi* *iroB, C, D, N,* *irp1, 2* *iucA, B, C, D, A* *kfuA, B, C* *mceA, B, C, D, E, G, H, I, J* *mrkA, B, C, D, F, H, I, J* *rmpA, A2, ybbW, Y, A, E, P, Q, S, T, U, X* *ylbE, ybtA, E, P, Q, S, T, U, X F*
Оценка вирулентности | Virulence score	1	0	5
Оценка устойчивости к противомикробным препаратам Antimicrobial resistance score	1	0	0
Группы несовместимости плазмид Incompatibility groups of plasmids	IncFIB(K), IncFII(K)	IncFIB(K)	IncHI1B, IncFIB(K)

ные и часто встречающиеся на территории России штаммы *K. pneumoniae*, принадлежащие ST23 [6], продолжают циркулировать среди населения и могут колонизировать кишечник новорождённого ребёнка без клинических проявлений инфекционного процесса. Данный факт свидетельствует о том, в условиях перинатального центра, как и в других лечебно-профилактических учреждениях, оказывающих медицинскую помощь на стационарном этапе, сохраняется риск реализации конвергенции свойств гипервирулентности и множественной лекарственной устойчивости [30], что является крайне нежелательным явлением из-за возникновения сложностей с лечением инвазивных инфекций и необходимостью выбора для эрадикационной терапии антибактериальных препаратов из группы резерва.

На протяжении более чем 6-месячного периода, предшествующего дате обнаружения штамма с гипермукоидным фенотипом и после неё, при проведении производственного микробиологического контроля изоляты с аналогичной фенотипической характеристикой в образцах от пациентов и смывах с объектов внутрибольничной среды не детектировались. Учитывая это, можно сделать вывод о том,

что штамм, выделенный из образца фекалий, был внебольничным. Проводимый локальный микробиологический мониторинг, анализ получаемых с его помощью данных позволяют своевременно выявлять и предупреждать совместное пребывание пациентов, выделяющих штаммы с гиперпродукцией слизи и устойчивых к антибактериальным препаратам, профилактируя тем самым перекрёстное инфицирование пациентов и нежелательные события изменчивости микроорганизмов, которые могли бы быть реализованы при их встрече в одном макроорганизме.

В настоящее время не существует единой системы регистрации и наблюдения за циркуляцией штаммов с гипермукоидным фенотипом *K. pneumoniae*. При этом их фенотипическая детекция реализована в широкой диагностической практике микробиологической службы во время работы с колониями бактерий на плотных пластинчатых питательных средах различного назначения, например, среде Эндо и кровяно-сывороточном агаре. Возможно, это связано с тем, что гипервирулентность не следует отождествлять с гиперпродукцией слизи, и до настоящего времени открытым остаётся вопрос о выборе наиболее информативного маркера вирулентности *K. pneumoniae* [20].

Три исследованных в настоящей работе штамма *K. pneumoniae*, два из которых выделены из положительной гемокультуры при генерализованной инфекции, а третий — из пробы фекалий при колонизации кишечника новорождённого ребёнка, фенотипически проявляющий гиперпродукцию слизи и обладающий наиболее широким спектром генов факторов вирулентности, обладали одинаковыми генетическими детерминантами *fimH*, *mrkA*, ассоциированными с плёнкообразующей способностью и синтезом фимбрий I и III типов. Интересно отметить, что ген *traT*, обеспечивающий сывороточную резистентность, был детектирован в штаммах, выделенных из проб крови, и не был обнаружен в изоляте, выделенном из фекалий, что, возможно, и не позволило ему преодолеть подслизистый слой кишечной стенки и предотвратило генерализацию инфекционного процесса.

Таким образом, впервые в России представлены результаты сравнительного геномного анализа клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных от новорождённых детей с различными исходами инфекционного процесса в неонатальном периоде, идентифицированы хорошо изученные и давно встречающиеся на всех континентах сиквенс-типы и клональные группы. В ходе настоящего исследования не выявлено конвергентных штаммов или штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Это является благоприятным эпидемиологическим признаком. Вместе с тем установлено, что в ходе локального микробиологического мониторинга в учреждении родовспоможения могут быть детектированы штаммы с высоким показателем вирулентности.

Выводы

1. Штаммы *K. pneumoniae* с единичными или несколькими детерминантами вирулентности встречаются среди пациентов неонатальных стационаров. Патогенный потенциал *K. pneumoniae* ST23 (индекс вирулентности 5) с фенотипически проявляющейся гиперпродукцией слизи не был реализован в виде инфекционного процесса в организме новорождённого ребёнка.

2. *K. pneumoniae* ST14 с меньшим спектром генов вирулентности, чем ST23, и низкой антибиотикорезистентностью (индекс вирулентности 0, антибиотикорезистентность 0) вызвал осложнение течения неонатального периода недоношенного ребёнка с врождёнными пороками развития ЦНС и сердечно-сосудистой системы в виде позднего сепсиса с летальным исходом. Этот случай демонстрирует сложность прогнозирования инфекционных осложнений на стационарном этапе выхаживания новорождённых недоношенных детей, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae*, исходя только из генетической и фенотипической характеристики микроорганизма и диктует необходимость комплексной оценки как бактериального штамма, так и состояния здоровья пациента.

3. Результаты проведённого исследования пополнили данные о генетическом разнообразии штаммов, ассоциированных с неонатальным периодом развития недоношенных новорождённых детей, и продемонстрировали необходимость дальнейшего изучения закономерностей развития осложнений инфекционного генеза, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, при их колонизации нестерильных локусов человеческого организма.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. D'Apolito D., Arena F., Conte V., et al. Phenotypical and molecular assessment of the virulence potential of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 clinical isolates. *Microbiol. Res.* 2020;240:126551. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126551
2. GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2022;400(10369):2221–48. DOI: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)02185-7
3. Эйдельштейн М.В., Шайдуллина Э.Р., Иванчик Н.В. и др. Антибиотикорезистентность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2024;26(1):67–78. Edelstein M.V., Shaidullina E.R., Ivanchik N.V., et al. Antimicrobial resistance of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Russian hospitals: results of a multicenter epidemiological study. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*.

2024;26(1):67–78.
DOI: https://doi.org/10.36488/cmac.2024.1.67-78
4. Дубоделов Д.В., Любасовская Л.А., Шубина Е.С. и др. Генетические детерминанты резистентности к β-лактамным антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных. *Генетика*. 2016;52(9):1097–102. DOI: https://doi.org/10.7868/S0016675816090046 EDN: https://elibrary.ru/wlnemr Dubodelov D.V., Lubasovskaya L.A., Shubina E.S., et al. Genetic determinants of resistance of hospital-associated strains of *Klebsiella pneumoniae* to β-lactam antibiotics isolated in neonates. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(9):993–8. DOI: https://doi.org/10.1134/S1022795416090040 EDN: https://elibrary.ru/xfhwgb
5. Кузьменко С.А., Брежнева Н.И., Гончаров А.Е., Тутельян А.В. Характеристика свойств внутрибольничной популяции *Klebsiella pneumoniae*. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019;4(2):58–65. Kuzmenko S.A., Brezhneva N.I., Goncharov A.E., Tutelyan A.V. Features of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* population. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019;4(2):58–65.
EDN: https://elibrary.ru/fwfxlj
6. Белова И.В., Точилина А.Г., Соловьева И.В. Характеристика госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих в педиатрическом стационаре. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО*. 2019;(8):25–9. Belova I.V., Tochilina A.G., Solov'eva I.V., et al. Characteristic of hospital *Klebsiella pneumoniae* strains circulating in the pediatric hospital. *Public Health and Life Environment – PH&LE.* 2019;(8):25–9.
DOI: https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-25-29
EDN: https://elibrary.ru/bbavei
7. Тапальский Д.В., Бонда Н.А., Карпова Е.В., Стома И.О. *Klebsiella pneumoniae* с множественной устойчивостью к антибиотикам в этиологии инфекций кровотока. *Клиническая инфектология и паразитология*. 2021;10(2):179–86. Tapalski D., Bonda N., Karpova E., Stoma I. Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* in the etiology of bloodstream infections. *Clinical Infectology and Parasitology*. 2021;10(2):179–86. DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.2.024
EDN: https://elibrary.ru/belhvf
8. Rahmat Ullah S., Irum S., Mahnoor I., et al. Exploring the resistome, virulome, and mobilome of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates: deciphering the molecular basis of carbapenem resistance. *BMC Genomics*. 2024;25(1):408. DOI: https://doi.org/10.1186/s12864-024-10139-y
9. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н. и др. Геномные особенности резистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кровяного русла и ликвора пациентов детского стационара. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(6):399–409. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., et al. Genomic features of resistant *Klebsiella pneumoniae*, isolated from the bloodstream and cerebrospinal fluid of pediatric hospital patients. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(6):399–409.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-430
EDN: https://elibrary.ru/ylxbdz
10. Moussa B., Hmami F., Arhoun B., et al. Intense intestinal carriage of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* co-harboring OXA-48, KPC, VIM, and NDM among preterm neonates in a Moroccan neonatal intensive care unit. *Cureus*. 2023;15(12):e50095.
DOI: https://doi.org/10.7759/cureus.50095
11. Шамина О.В., Крыжановская О.А., Лазарева А.В., и др. Устойчивость карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* к колистину: молекулярные механизмы и бактериальный фитнес. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2020;(3):11–8.
EDN: https://elibrary.ru/lvaxwk
Shamina O.V., Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., et al. Colistin resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains: molecular mechanisms and bacterial fitness. *Bulletin Of Russian State Medical University*. 2020;(3):11–8.
DOI: https://doi.org/10.24075/brsmu.2020.032
EDN: https://elibrary.ru/dipfgb
12. Садеева З.З., Новикова И.Е., Лазарева А.В. и др. Бактериемии и инфекции ЦНС у детей, ассоциированные с *Klebsiella pneumoniae*: молекулярно-генетическая характеристика и клинические особенности. *Инфекция и иммунитет*. 2023;13(6):1117–28. Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Lazareva A.V., et al. Pediatric bacteremia and CNS infections associated with *Klebsiella pneumoniae*: molecular genetic characteristics and clinical features. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2023;13(6):1117–28.
DOI: https://doi.org/10.15789/2220-7619-PBA-14482
EDN: https://elibrary.ru/hysajo
13. Starkova P., Lazareva I., Avdeeva A., et al. Emergence of hybrid resistance and virulence plasmids harboring New Delhi Metallo-β-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(6):691.
DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics10060691
14. Степанова Т.Ф., Катаева Л.В., Посоюзных О.В. и др. Структура ESKAPE-патогенов, изолированных от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых Национального госпиталя педиатрии г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):168–77. Stepanova T.F., Kataeva L.V., Posoyuznykh O.V., et al. The structure of ESKAPE pathogens isolated from patients of the neonatal intensive care unit at the national hospital of pediatrics in Hanoi, the socialist republic of Vietnam. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(2):168–77.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-329
EDN: https://elibrary.ru/aamnei
15. Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Изучение влияния ферментного препарата Вобэнзим на процесс формирования биоплёнок штаммов бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024;69(1-2):10–4. Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I. Study of the Wobenzym enzyme preparation effect on the formation of bacterial biofilms. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2024;69(1-2):10–4. DOI: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-1-2-10-14
EDN: https://elibrary.ru/vrvrao
16. Leggett R.M., Ramirez-Gonzalez R.H., Clavijo B.J., et al. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Front. Genet*. 2013;4:288. DOI: https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00288
17. Lee C.Y., Lee Y.F., Lai L.C., et al. MiDSystem: a comprehensive online system for de novo assembly and analysis of microbial genomes. *N. Biotechnol*. 2021;65:42–52.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.08.002
18. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol*. 2005;43(8):4178–82.
DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005
19. Lam M.M.C., Wick R.R., Judd L.M., et al. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex. *Microb. Genom*. 2022;8(3):000800.
DOI: https://doi.org/10.1099/mgen.0.000800
20. Kumabe A., Kenzaka T. String test of hypervirulent *Klebsiella pneumonia. QJM*. 2014;107(12):1053.
DOI: https://doi.org/10.1093/qjmed/hcu124
21. Kopotsa K., Mbelle N.M., Osei Sekyere J. Epigenomics, genomics, resistome, mobilome, virulome and evolutionary phylogenomics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Microb. Genom*. 2020;6(12):mgen000474.
DOI: https://doi.org/10.1099/mgen.0.000474

22. Arena F., Giani T., Becucci E., et al. Large oligoclonal outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST26 producing the FOX-7 AmpC β-lactamase in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol*. 2013;51(12):4067–72. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.01982-13
23. Hosbul T., Guney-Kaya K., Guney M., et al. Carbapenem and colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST2096 dominated in two hospitals in Turkey. *Clin. Lab*. 2021;67(9). DOI: https://doi.org/10.7754/clin.lab.2021.201226
24. Naha S., Sands K., Mukherjee S., et al. OXA-181-Like carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* ST14, ST15, ST23, ST48, and ST231 from septicemic neonates: coexistence with NDM-5, resistome, transmissibility, and genome diversity. *mSphere*. 2021;6(1):e01156–20. DOI: https://doi.org/10.1128/msphere.01156-20
25. Mshana S.E., Hain T., Domann E., et al. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect. Dis*. 2013;13:466. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-466
26. Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Маханёк А.А. Распространенность генов антибиотикорезистентности bla-CTX-M, bla-SHV, bla-TEM в штаммах энтеробактерий, выделенных от пациентов перинатального центра. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(3):44–9. Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Makhanyok A.A. Prevalence of antibiotic resistance genes bla-CTX-M, bla-SHV, bla-TEM in enterobacteria strains isolated from perinatal center patients. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(3):44–9. DOI: https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-3-44-49 EDN: https://elibrary.ru/hlwyoc
27. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health*. 2018;112(3):142–51. DOI: https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1460949
28. Liu Y., Jian Z., Wang Z., et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of ST23 *Klebsiella pneumoniae* in China. *Infect. Drug Resist*. 2023;16:7597–611. DOI: https://doi.org/10.2147/idr.s428067
29. Zhang Q.B., Zhu P., Zhang S., et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* detection methods: a minireview. *Arch. Microbiol*. 2023;205(10):326. DOI: https://doi.org/10.1007/s00203-023-03665-y
30. Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae. Инфекция и иммунитет*. 2022;12(3):450–60. Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae. Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(3):450–60. DOI: https://doi.org/10.15789/2220-7619-COM-1825 EDN: https://elibrary.ru/ucpmnf

Информация об авторах

Устюжанин Александр Владимирович✉ — канд. мед. наук, в. н. с. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики Уральского научно-исследовательского института охраны материнства и младенчества, Екатеринбург, Россия, ust103@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-8521-7652

Маханёк Анна Алексеевна — м. н. с. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики Уральского научно-исследовательского института охраны материнства и младенчества, Екатеринбург, Россия, makhanechek@bk.ru, https://orcid.org/0000-0002-2834-6754

Чистякова Гузель Нуховна — д-р мед. наук, профессор, рук. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики Уральского научно-исследовательского института охраны материнства и младенчества, Екатеринбург, Россия, chistyakovagn@niiomm.ru, https://orcid.org/0000-0002-0852-6766

Ремизова Ирина Ивановна — канд. биол. наук, с. н. с. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики Уральского научно-исследовательского института охраны материнства и младенчества, Екатеринбург, Россия, remizovaii@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-4238-4642

Участие авторов: *Устюжанин А.В.* — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка образцов, ПЦР, сборка последовательностей обработка, анализ данных, написание текста, редактирование; *Маханёк А.А.* — подготовка обзора литературы, обсуждение дизайна исследования; *Чистякова Г.Н.* — руководство; *Ремизова И.И.* — концепция и дизайн 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 17.05.2024;
принята к публикации 01.08.2024;
опубликована 30.01.2025

Information about the authors

Alexander V. Ustyuzhanin✉ — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnostics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Yekaterinburg, Russia, ust103@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-8521-7652

Anna A. Makhanyok — junior researcher, Department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnostics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Yekaterinburg, Russia, makhanechek@bk.ru, https://orcid.org/0000-0002-2834-6754

Guzel N. Chistyakova — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnostics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Yekaterinburg, Russia, chistyakovagn@niiomm.ru, https://orcid.org/0000-0002-0852-6766

Irina I. Remizova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnostics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Yekaterinburg, Russia, remizovaii@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-4238-4642

Authors' contribution: *Ustyuzhanin A.V.* — research concept and design, sample collection and processing, PCR, sequence assembly, data analysis, writing; *Makhanyok A.A.* — research concept and design, writing; *Chistyakova G.N.* — supervision; *Remizova I.I.* — research concept and design. 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 17.05.2024;
accepted for publication 01.08.2024;
published 30.01.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-569

Влияние штамма *Enterococcus faecium* 18 на грибы рода *Candida*

Пашинина О.А.✉, Пашкова Т.М., Сычева М.В., Попова Л.П., Карташова О.Л.

Оренбургский федеральный исследовательский центр, Оренбург, Россия

Аннотация

Введение. Энтерококки, являющиеся представителями нормобиоты кишечника, играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек, продуцируя антимикробные соединения, и поэтому широко используются в качестве основы пробиотических препаратов. В последнее десятилетие серьёзной клинической проблемой стали инфекции, вызванные грибами рода *Candida*. В связи с этим актуальной является оценка пробиотических характеристик штамма *Enterococcus faecium* 18 и изучение его противогрибковой активности.

Цель работы — исследовать влияние штамма *E. faecium* 18 на рост и зрелую биоплёнку грибов рода *Candida*, а также охарактеризовать его агрегационную и коагрегационную способности.

Материалы и методы. Влияние на рост грибов определяли по динамике оптической плотности бульонных культур, воздействие супернатанта энтерококка на сформированные биоплёнки исследовали в стерильных полистироловых 96-луночных планшетах. Пробиотический потенциал *E. faecium* 18 оценивали по его способности к аутоагрегации и коагрегационному взаимодействию с 20 штаммами грибов рода *Candida* разных видов: *C. albicans, C. krusei, C. kefir, C. glabrata*. Для получения изображений использовали метод сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Показано ингибирующее действие супернатанта *E. faecium* 18 на рост грибов рода *Candida* всех исследуемых видов, а также их зрелые биоплёнки. Уровень ингибирования роста сформированных биоплёнок у *non-albicans* видов составил 58,6–72,9%; у *C. albicans* — 51,4%. Показатели аутоагрегации *E. faecium* 18 составили 57,6% через 2 ч инкубации и 60,4% через 5 ч. Штамм *E. faecium* 18 демонстрировал разные уровни коагрегации с исследованными видами грибов рода *Candida*, при этом индекс показателя через 5 ч культивирования оказался выше у видов *non-albicans*, максимальным значением характеризовался вид *C. glabrata* (85,6%).

Заключение. Полученные экспериментальные данные позволяют рассматривать изученный штамм в качестве основы пробиотика, оказывающего антикандидозное действие.

Ключевые слова: *Enterococcus faecium, Candida, зрелые сформированные биоплёнки, коагрегация, аутоагрегация*

Источник финансирования. Исследования проведены в рамках госзадания FUUG-2022-0007 «Исследование симбиотических систем про- и эукариот в биологии и медицине».

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

Для цитирования: Пашинина О.А., Пашкова Т.М., Сычева М.В., Попова Л.П., Карташова О.Л. Влияние штамма *Enterococcus faecium* 18 на грибы рода *Candida*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):72–79.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-569
EDN: https://www.elibrary.ru/zvdoso

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-569

Effect of *Enterococcus faecium* strain 18 on fungi of the genus *Candida*

Olga A. Pashinina✉, Tatiana M. Pashkova, Maria V. Sycheva, Lydia P. Popova, Olga L. Kartashova

Orenburg Federal Research Center, Orenburg, Russia

Abstract

Introduction. *Enterococcus* spp. which are representatives of the intestinal normal microbiota, play an important role in ensuring colonization resistance of mucous membranes, producing antimicrobial compounds, and therefore are widely used as the basis of probiotic drugs. In the last decade, infections caused by *Candida* fungi have become a serious clinical problem. In this regard, it is relevant to evaluate the probiotic characteristics of the *E. faecium* strain 18 and study its antifungal activity.

© Пашинина О.А., Пашкова Т.М., Сычева М.В., Попова Л.П., Карташова О.Л., 2025

The **aim** is to investigate the effect of the *E. faecium* strain 18 on the growth and mature biofilm of *Candida* spp., as well as to characterize its agregation and coagregation abilities.
Materials and methods. The effect on fungal growth was determined by the dynamics of the optical density of broth cultures; the effect of enterococcus supernatant on formed biofilms was studied in sterile polystyrene 96-well plates. The probiotic potential of *E. faecium* strain 18 was assessed by its ability to autoagregate and coagregate interaction with 20 strains of *Candida* of different species — *C. albicans*, *C. krusei*, *C. kefir*, *C. glabrata*. The scanning electron microscopy was used to obtain images.
Results. The inhibitory effect of the supernatant of *E. faecium* strain 18 has been shown to affect the growth of *Candida* of all studied species, as well as their mature biofilms. The level of inhibition of the growth of formed biofilms in non-albicans species was 58.6–72.9% and 51.4% for *C. albicans*. The autoagregation rates of *E. faecium* strain 18 were 57.6% after 2 hours of incubation and 60.4% after 5 hours. *E. faecium* strain 18 demonstrated different levels of coagregation with the studied species of *Candida*, with the index values observed after 5 hours of cultivation being higher in *non-albicans* species, and the maximum value recorded for *C. glabrata* (85.6%).
Conclusion. The experimental data obtained allow us to consider the studied strain as the basis for a probiotic that has an anti-candidiasis effect.

Keywords: *Enterococcus faecium, Candida, mature formed biofilms, coagregation, autoagregation*

Funding source. Research was carried out within the framework of the state task FUUG — 2022-0007 “Study of symbiotic systems of pro- and eukaryotes in biology and medicine”.

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

For citation: Pashinina O.A., Pashkova T.M., Sycheva M.V., Popova L.P., Kartashova O.L. Effect of *Enterococcus faecium* strain 18 on fungi of the genus *Candida*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):72–79.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-569
EDN: https://www.elibrary.ru/zvdoso

Введение

В последнее десятилетие инфекции, вызванные грибами рода *Candida*, стали серьёзной клинической проблемой [1]. Рост числа грибковых инфекций требует разработки новых противогрибковых средств. Весьма перспективным является использование пробиотических микроорганизмов и/или продуцируемых ими соединений для контроля распространения патогенных видов рода *Candida* [2]. Клинические наблюдения показывают, что пробиотические препараты могут уменьшить колонизацию *Candida* spp. на поверхности слизистых оболочек человека, облегчить признаки и симптомы грибковой инфекции и усилить противогрибковый эффект традиционной терапии [3].

Опубликован ряд исследований, в которых пробиотики рассматриваются не только как возможное средство лечения больных кандидозом [4], но и как препараты для борьбы с биоплёнками *Candida* spp. [5].

Энтерококки, являющиеся представителями нормобиоты кишечника, играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек, характеризуются наличием спектра антимикробных субстанций, в частности, продуцируют энтероцины — антимикробные пептиды, обладающие активностью против патогенов [6], и поэтому широко используются в качестве основы пробиотических препаратов [7].

Поиск и отбор штаммов энтерококков, обладающих антифунгальной активностью, ведутся среди представителей этого рода ещё и потому, что условно-патогенные дрожжи *Candida* spp. часто выделяются совместно с бактериями рода *Enterococcus* из различных биотопов и очагов инфекции в организме человека, что свидетельствует об их межклеточном взаимодействии [8, 9].

Ранее нами изучено влияние разных штаммов *E. faecium*, выделенных из кишечника человека, на способность грибов рода *Candida* снижать образование биоплёнок и отобран штамм *E. faecium* 18 с максимальной активностью [10], который может быть использован в качестве основы пробиотика, оказывающего антикандидозное действие.

Цель данной работы — исследовать влияние штамма *E. faecium* 18 на рост и зрелую биоплёнку грибов рода *Candida*, а также его агрегационную и коагрегационную способности, являющиеся важными свойствами перспективных пробиотических штаммов [11].

Материалы и методы

Для проведения исследований использовали штамм *E. faecium* 18 из коллекции кафедры микробиологии и заразных болезней Оренбургского государственного аграрного университета, который депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры

© Pashinina O.A., Pashkova T.M., Sycheva M.V., Popova L.P., Kartashova O.L., 2025

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-569

Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского под коллекционным номером 1252. Энтерококк выращивали в Schaedler-бульоне («Conda») в течение 24 ч при 37ºС. Бактериальные клетки удаляли центрифугированием при ускорении 9000*g* под охлаждением до 4ºС в течение 15 мин. Полученный супернатант фильтровали через 0,22-мкм фильтр («Millipore Nihon») и сразу использовали в экспериментах. Антикандидозную активность *E. faecium* 18 исследовали на 4 видах дрожжеподобных грибов рода *Candida*, полученных из кишечника условно здоровых людей (*C. albicans, C. krusei, C. kefir, C. glabrata*), всего 20 штаммов (коллекция лаборатории персистенции и симбиоза Института клеточного и внутриклеточного симбиоза). Культуры грибов выращивали аэробно на среде Сабуро с декстрозой («Hi Media») при 35ºС в течение 24 ч.

Для определения антикандидозной активности использовали метод микротитрования в питательной среде на стерильных полистироловых 96-луночных планшетах («Sigma-Aldrich Chemie») согласно S. Wang и соавт. [12] с изменениями. В лунки стерильного микропланшета вносили 100 мкл бульона Сабуро, содержащего 2×10^5 КОЕ/лунку *Candida* и 100 мкл супернатанта энтерококка. Каждую пробу испытывали параллельно в 4 лунках. В качестве положительного контроля использовали суспензию клеток грибов на питательной среде без супернатанта, в качестве отрицательного контроля — Schaedler-бульон. После аэробной инкубации при 37ºС в течение 24 ч рост грибов определяли по оптической плотности (ОП) при длине волны 492 нм с использованием полуавтоматического планшетного спектрофотометра «Stat Fax 2100» («Awareness Technology»).

При изучении влияния супернатанта энтерококка на грибную сформированную биоплёнку культуры *Candida* культивировали в течение 48 ч при 37ºС, после удаления взвеси и отмывания лунок добавляли супернатант *E. faecium* 18 в объёме 100 мкл. Планшеты помещали в термостат при 37ºС на 24 ч, затем замеряли ОП на полуавтоматическом планшетном спектрофотометре «Stat Fax 2100» («Awareness Technology»). Контролем служили штаммы грибов рода *Candida*, не подвергавшиеся влиянию супернатанта энтерококка. Эксперимент проводили в 3 повторах с интервалом 24 ч.

Способность штамма *E. faecium* 18 к аутоагрегации оценивали в соответствии с методом K.M.O. dos Santos и соавт. [13] с небольшими изменениями. Культуру энтерококка, полученную в Schaedler-бульоне после 24-часовой инкубации при 37ºС, собирали центрифугированием при 9000*g* в течение 10 мин при 4ºС. Клетки дважды промывали в физиологическом растворе, обогащённом фосфатом (PBS; pH 7,2 перед стерилизацией), и суспендировали в PBS при начальной ОП, измеренной при длине волны 630 нм. Затем бактериальную суспензию (2 мл) перемешивали в течение 10 мин с помощью «SPINIX Vortex» («Parsons») и инкубировали при 37ºС в течение 5 ч без перемешивания. Для замера ОП образца в начале инкубации и через 2 и 5 ч культивирования использовали 1 мл верхнего слоя для измерения при 630 нм. Определяли аутоагрегацию (*AA*) по формуле:

$$AA = [(\text{ОП начальная} - \text{время ОП}/\text{ОП начальное}] \times 100\%. \quad (1)$$

Коагрегационный анализ взвесей энтерококков с дрожжеподобными грибами проводили по модифицированному методу K.M.O. dos Santos и соавт. [13].

Культуры энтерококков выращивали в 3 мл Schaedler-бульона, а грибов рода *Candida* — в 3 мл бульона Сабуро при 37ºС в течение 24 ч, после чего культуры центрифугировали 10 мин в центрифуге «Microspin 12» («Biosan») с охлаждением (4ºС) при ускорении 9000*g* и промывали в PBS (pH 7,2 перед стерилизацией), данные манипуляции повторяли дважды, затем суспендировали взвеси в PBS.

На следующем этапе равные объёмы (по 750 мкл) взвеси культуры *E. faecium* 18 и взвеси тест-штаммов грибов рода *Candida* spp. попарно смешивали встряхиванием в течение 10 с и замеряли ОП каждой взвеси при длине волны 630 нм (начальное значение ОП — 0 ч). Пробирки инкубировали при 37ºС без перемешивания в течение 5 ч, замеряя ОП через 2 и 5 ч инкубации в 1 мл верхнего слоя проб при длине волны 630 нм (время ОП).

Коагрегацию (*A*) рассчитывали по формуле:

$$A = [(\text{начальная ОП} - \text{время ОП}/\text{начальная ОП}] \times 100\%. \quad (2)$$

Подготовку образцов для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проводили следующим образом: взвеси культуры энтерококка и взвеси культуры энтерококка с тест-штаммами грибов в физиологическом растворе в концентрации 10^9 КОЕ/мл трижды отмывали 0,1 М фосфатно-буферным раствором Соренсена («ЛидерМед Групп») и добавляли 400 мкл 2,5% глутарового альдегида к последнему осадку. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 4ºС и вновь отмывали 0,1 М фосфатно-буферным раствором, обезвоживали водно-этанольными растворами с возрастающими концентрациями (20, 40, 60, 80 и 90% и 2 цикла 100%) и наносили на покровные стекла. Время инкубации в каждом растворе составляло15 мин при комнатной температуре. Покровные стекла с образцами высушивали в критической точке «Quorum K850 Critical Point Dryer» («Quorum Technologies Ltd.»), прикрепляли двусторонним скотчем к столику СЭМ и напыляли золотом с помощью установки

ионно-плазменного напыления «Quorum Q150R S plus» («Quorum Technologies Ltd.»). СЭМ проводили на сканирующем электронном микроскопе «Tescan Mira 3» («Tescan Brno») Центра коллективного пользования образовательного Центра выявления и поддержки одарённых детей «Гагарин» (Оренбург).

Полученные данные статистически обработаны с помощью критерия Стьюдента в программе «Statistica 6.0» («StatSoft, Inc.»). Результаты представлены в виде средних значений и ошибок средних ($M \pm m$), полученных не менее чем в 3 независимых экспериментах. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Установлено ингибирующее действие супернатанта *E. faecium* 18 на рост грибов рода *Candida* всех исследуемых видов. В положительном контроле уровень ОП суточной бульонной культуры грибов у *C. albicans* составлял 0,73 ± 0,02; у *C. glabrata* — 0,41 ± 0,01; у *C. kefir* — 0,32 ± 0,01; у *C. krusei* — 0,69 ± 0,02, а при добавлении супернатанта снижался до 0,37 ± 0,01; 0,25 ± 0,01; 0,15 ± 0,01; 0,35 ± 0,02 КОЕ/мл соответственно (**рис. 1**, *а*).

Наиболее высокий уровень ингибиции отмечен для *C. kefir* — в 2,1 раза. Несколько ниже была степень ингибирования *C. albicans* и *C. krusei*, у которых уровень роста снижался в 2 раза, а у *C. glabrata* — в 1,6 раза.

В следующей серии экспериментов изучали влияние супернатанта *E. faecium* 18 на сформированные грибами рода *Candida* биоплёнки. В контроле среднее значение коэффициента биоплёнкообразования (КБО) у *C. albicans* составляло 3,50 ± 0,01

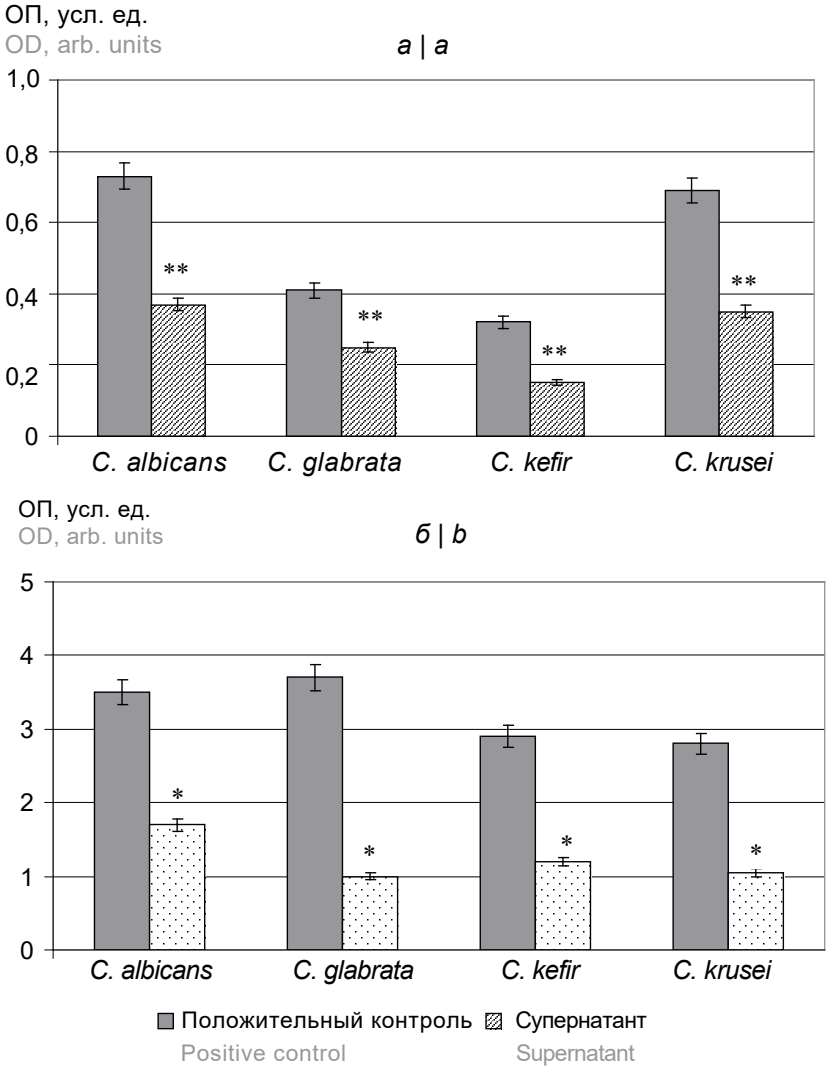


Рис. 1. Влияние супернатанта *E. faecium* 18 на рост (*а*) и сформированные биоплёнки (*б*) грибов рода *Candida.*

*$p < 0,05$; **$p < 0,001$.

Fig. 1. The effect of the supernatant of *E. faecium* strain 18 on the growth (*a*) and formed biofilms (*b*) of fungi of the genus *Candida.*

*$p < 0.05$; **$p < 0.001$.

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-569

усл. ед., *C. glabrata* — 3,70 ± 0,02 усл. ед., *C. kefir* — 2,90 ± 0,02 усл. ед., *C. krusei* — 2,80 ± 0,02 усл. ед.

Установлена способность супернатанта энтерококка разрушать зрелые биоплёнки изученных видов грибов (рис. 1, *б*). Так, он достоверно ингибировал рост сформированных биоплёнок *C. albicans* на 51,4% (КБО 1,70 ± 0,01 усл. ед.; $p < 0,05$), *C. glabrata* — на 72,9% (КБО 1,00 ± 0,01 усл. ед.; $p < 0,05$), *C. kefir* — на 58,6% (КБО 1,20 ± 0,01 усл. ед.; $p < 0,05$), *C. krusei* — на 62,5% (1,05 ± 0,01 усл. ед.; $p < 0,05$).

Таким образом, проведённые исследования свидетельствуют о том, что супернатант *E. faecium* 18 способен не только ингибировать рост штаммов разных видов грибов рода *Candida*, но и разрушать сформированные ими биоплёнки.

Коагрегация *E. faecium* 18 с *Candida* spp.
E. faecium strain18 coagregation with *Candida* spp.

Candida spp.	Индекс коагрегации с *E. faecium* 18, % Coagregation index with *E. faecium* 18, %	
	2 ч | 2 h	5 ч | 5 h
C. albicans	29,7 ± 0,04	37,2 ± 0,03
C. glabrata	56,2 ± 0,07	85,6 ± 0,05
C. kefir	22,7 ± 0,03	45,9 ± 0,03
C. krusei	26,8 ± 0,04	55,9 ± 0,04

Далее нами изучены агрегационная и коагрегационная способности культуры *E. faecium* 18, являющиеся важными свойствами перспективных пробиотических штаммов. Показано, что значения аутоагрегации *E. faecium* 18 увеличивались в зависимости от продолжительности инкубационного периода: от 57,6% (2 ч) до 60,4% (5 ч). Результаты аутоагрегации энтерококка проиллюстрированы на **рис. 2**.

Вместе с тем штамм *E. faecium* 18 проявлял различные уровни коагрегации у 4 исследованных видов грибов (**таблица**). Индекс коагрегации увеличивался с ростом инкубационного периода. После 5-часовой инкубации самый высокий уровень коагрегации наблюдался с изолятами *C. glabrata* (85,6%), далее следовали *C. krusei* (55,9%), *C. kefir* (45,9%), *C. albicans* (37,2%). Результаты коагрегации *E. faecium* со штаммами *C. albicans* представлены на **рис. 3**.

Обсуждение

Проведённые исследования показали, что супернатант *E. faecium* 18 обладает выраженной анти-

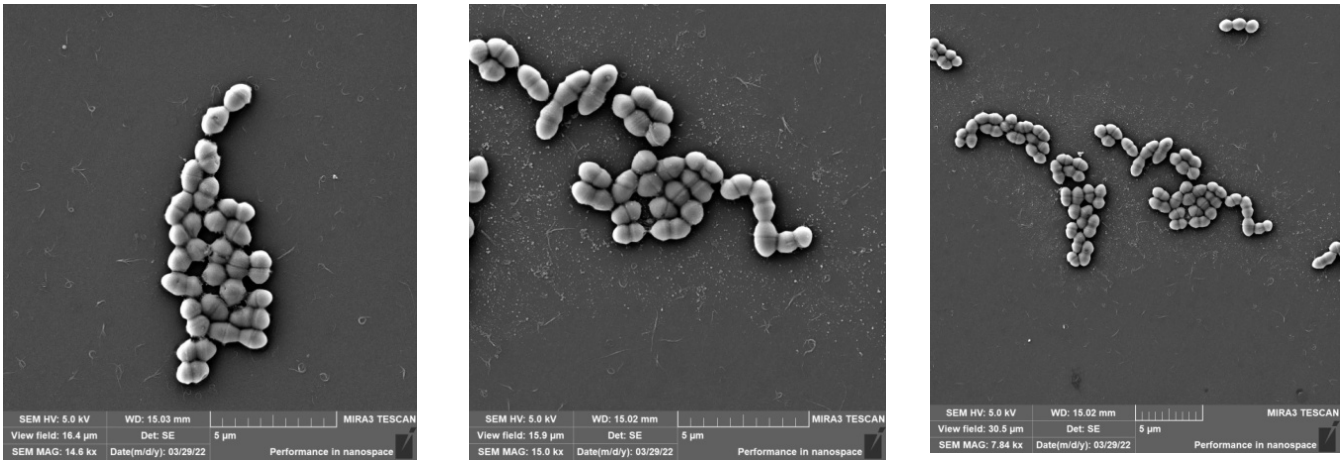


Рис. 2. Аутоагрегация *E. faecium* 18.
Fig. 2. Autoagregation of *E. faecium* strain 18.

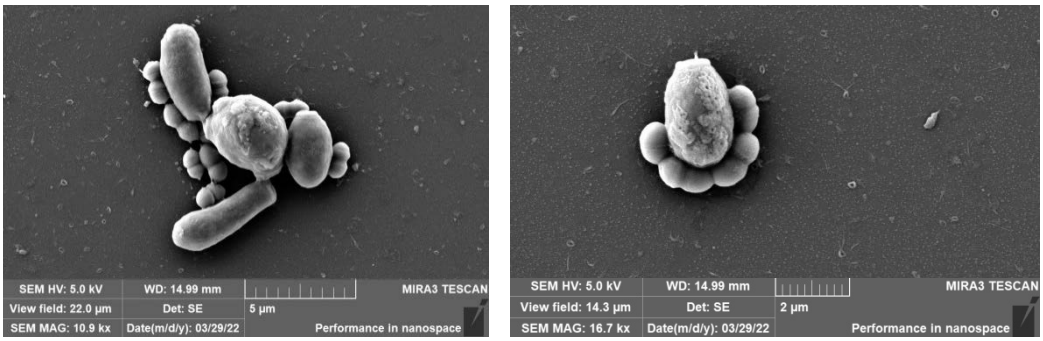


Рис. 3. Коагрегация *E. faecium* 18 с *C. albicans*.
Fig. 3. Coaggregation of *E. faecium* strain 18 with *C. albicans*.

микробной активностью в отношении грибов рода *Candida* и способностью разрушать сформированную биоплёнку исследованных видов грибов.

Полученные данные представляют интерес для клинической практики, т. к. известна способность грибов функционировать в составе многоклеточных сообществ (биоплёнок) [14, 15], которые препятствуют проникновению лекарственных средств, что повышает устойчивость микроорганизмов к антимикотикам [16, 17], а также являются одной из основных стратегий выживания этих микроорганизмов в организме человека [18].

Поэтому в настоящее время важной задачей является поиск средств борьбы с биоплёнками грибов рода *Candida*; в частности, пробиотических микроорганизмов, способных разрушать биоплёнки грибов и/или ингибировать их рост [19].

Проведённые нами исследования иллюстрируют *in vitro* эффект бесклеточного супернатанта энтерококка, который обладает чётко выраженным ингибирующим действием на сформированную биоплёнку грибов рода *Candida.* Полученные результаты не противоречат исследованиям ряда авторов, изучавших антибиоплёночную активность молочнокислых бактерий на изолятах *Candida* spp. [20]. Несмотря на то что основным механизмом ингибирования образования биоплёнки *Candida* spp. является конкуренция за адгезию, M. Kıvanç и соавт. пришли к выводу о том, что вещества, содержащиеся в бесклеточных фильтратах молочнокислых бактерий, также важны [21]. Так, в ряде работ показан ингибирующий эффект молочнокислых микроорганизмов в отношении биоплёнкообразующей способности патогенов, что, по мнению авторов, является результатом выработки органических кислот, включая молочную [22, 23].

Принимая во внимание тот факт, что, по результатам полногеномного секвенирования, включённый в исследование штамм энтерококка не способен к продукции бактериоцинов [24], можно предположить, что разрушение зрелых биоплёнок *Candida* spp. не связано с продукцией энтероцинов. Последнее предположение находит подтверждение в работе X. Pang и соавт. (2022), которые доказали, что бактериоцины могут эффективно ингибировать образование биоплёнок дозозависимым образом, но им трудно разрушить предварительно сформированные биоплёнки [25].

Эффективность пробиотика во многом зависит от адгезивной способности пробиотического штамма и отсутствия конкурентных отношений с индигенной микрофлорой. Аутоагрегация является первым этапом в процессе адгезии, позволяя бактериям формировать барьер против колонизации патогенов [26]. Взаимосвязь между образованием биоплёнки и агрегацией у непатогенных штаммов энтерококков впервые показана K. Veljovic и соавт. [27].

Высокая аутоагрегация и способность прилипать к эпителиальным клеткам и поверхностям слизистых оболочек является важным свойством многих штаммов бактерий, используемых в качестве пробиотиков [28, 29]. В нашем исследовании штамм энтерококка показал высокий уровень аутоагрегации уже через 2 ч, что свидетельствует о его конкурентных, исключающих патоген, свойствах. Сильная агрегация пробиотического штамма способствует достижению им достаточной массы для формирования биоплёнок и усилению его способности к коагрегации с потенциальным патогеном. В результате коагрегативных взаимодействий пробиотические штаммы микроорганизмов оказывают антагонистическое действие против патогенов [30].

Проведёнными нами исследованиями показана способность штамма энтерококка к коагрегации с разными видами грибов рода *Candida*, при этом индекс показателя через 5 ч культивирования оказался выше с non-albicans-видами, а максимальное значение достигнуто с *C. glabrata*.

Заключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что противокандидозный эффект *E. faecium* 18 включает различные механизмы, что в совокупности отражает сложность взаимодействия между грибами рода *Candida* и *E. faecium*, расширяя представления о механизмах межмикробного взаимодействия и открывая перспективы дальнейшего изучения энтерококка в качестве основы пробиотика, оказывающего антикандидозное действие. Чтобы использовать этот штамм в пробиотических препаратах, необходимо провести его дальнейшие испытания на животных моделях и оценить лечебный потенциал.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Шулакова Н.И. Микологический айсберг: современные сдвиги в эпидемиологии микозов. *Инфекционные болезни*. 2022;20(1):120–6. Akimkin V.G., Tutelyan A.V., Shulakova N.I. Medical mycological iceberg: recent trends in the epidemiology of mycoses. *Infectious Diseases*. 2022;20(1):120–6.
DOI: https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-1-120-126
EDN: https://elibrary.ru/kxiyal
2. Gladysheva I.V., Chertkov K.L., Cherkasov S.V., et al. Probiotic potential, safety properties, and antifungal activities of *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 and *Corynebacterium amycolatum* ICIS 53 strains. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2023;15(3):588–600.
DOI: https://doi.org/10.1007/s12602-021-09876-3
3. Matsubara V.H., Bandara H.M., Mayer M.P., Samaranayake L.P. Probiotics as antifungals in mucosal candidiasis. *Clin. Infect. Dis*. 2016;62(9):1143–53.
DOI: https://doi.org/10.1093/cid/ciw038
4. Ohshima T., Kojima Y., Seneviratne C.J., Maeda N. Therapeutic application of synbiotics, a fusion of probiotics and prebiotics, and biogenics as a new concept for oral candida infections:

a mini review. *Front. Microbiol*. 2016;7:10. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00010
5. Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Hosseiniyan Khatibi S.M., et al. The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infect. Drug Resist*. 2020;13:659–72. DOI: https://doi.org/10.2147/idr.s232982
6. Wu Y., Pang X., Wu Y., et al. Enterocins: classification, synthesis, antibacterial mechanisms and food applications. *Molecules*. 2022;27(7):2258. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules27072258
7. Rahmani M., Saffari F., Domann E., et al. Enterococci as intestinal microbiota: investigation of characteristics and probiotic potential in isolates from adults and breast-fed infants. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2022;14(6):1139–50. DOI: https://doi.org/10.1007/s12602-022-09951-3
8. Alshanta O.A., Albashaireh K., McKloud E., et al. *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* biofilm frenemies: when the relationship sours. *Biofilm*. 2022;4:100072. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100072
9. Kart D., Yabanoğlu Çiftçi S., Nemutlu E. Metabolomics-driven approaches on interactions between *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilms. *Turk J. Pharm. Sci*. 2021;18(5):557–64. DOI: https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.71235
10. Сычева М.В., Пашинина О.А., Карташова О.Л. и др. Штамм бактерий *Enterococcus faecium*, обладающий способностью снижать образование биопленок грибами рода *Candida*. Патент РФ № 2576008; 2016. Sycheva M.V., Pashinina O.A., Kartashova O.L., et al. Strain of bacteria *Enterococcus faecium* with ability to reduce formation of biofilms by *Candida fungus*. Patent RF № 2576008; 2016. EDN: https://elibrary.ru/zmhurf
11. Binda S., Hill C., Johansen E., et al. Criteria to qualify microorganisms as "probiotic" in foods and dietary supplements. *Front. Microbiol*. 2020;11:1662. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662
12. Wang S., Wang Q., Yang E., et al. Antimicrobial compounds produced by vaginal *Lactobacillus crispatus* are able to strongly inhibit *Candida albicans* growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions. *Front. Microbiol*. 2017;8:564. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00564
13. dos Santos K.M.O., Vieira A.D.S., Buriti F.C.A., et al. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Sci. Technol*. 2015;95(2):209–30. DOI: https://doi.org/10.1007/s13594-014-0201-6
14. Кольцов И.П., Стрельникова Н.В., Витько Е.В. и др. Микробиологические свойства условно-патогенных сахаромицетов рода *Candida* при хронических, рецидивирующих инфекционно-воспалительных процессах (обзор литературы). *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2023;(1):19–26. Koltsov I.P., Strelnikova N.V., Vitko E.V., et al. Microbiological properties of opportunistic saccharomycetes of the genus *Candida* in chronic, recurrent infectious inflammatory processes (literature review). *The Pacific Medical Journal*. 2023;(1):19–26. DOI: https://doi.org/10.34215/1609-1175-2023-1-19-26 EDN: https://elibrary.ru/txfejs
15. Ponde N.O., Lortal L., Ramage G., et al. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit. Rev. Microbiol*. 2021;47(1):91–111. DOI: https://doi.org/10.1080/1040841x.2020.1843400
16. Demin K.A., Refeld A.G., Bogdanova A.A., et al. Mechanisms of *Candida* resistance to antimycotics and promising ways to overcome it: the role of probiotics. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2021;13(4):926–48. DOI: https://doi.org/10.1007/s12602-021-09776-6
17. Kaur J., Nobile C.J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol*. 2023;71:102237. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102237
18. Roy S., Gow N.A.R. The role of the *Candida* biofilm matrix in drug and immune protection. *Cell Surf*. 2023;10:100111. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2023.100111
19. Пашинина О.А., Сычева М.В., Марисова Е.В. Эффект влияния бактериоцинсодержащей культуральной жидкости *Enterococcus faecium* EF79OSAU на способность к биопленкообразованию Candida albicans. *Проблемы медицинской микологии*. 2023;25(2):158. Pashinina O.A., Sycheva M.V., Marisova E.V. The effect of bacteriocin-containing cultural liquid *Enterococcus faecium* EF79OSAU on the biofilm formation ability of *Candida albicans*. *Problems in Medical Mycology*. 2023;25(2):158. EDN: https://elibrary.ru/wrttxh
20. Vilela S.F., Barbosa J.O., Rossoni R.D., et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in Galleria mellonella. *Virulence*. 2015;6(1):29–39. DOI: https://doi.org/10.4161/21505594.2014.981486
21. Kıvanç M., Er S. Biofilm formation of *Candida* spp. isolated from the vagina and antibiofilm activities of lactic acid bacteria on the these *Candida* isolates. *Afr. Health Sci*. 2020;20(2):641–8. DOI: https://doi.org/10.4314/ahs.v20i2.12
22. Shokri D., Khorasgani M.R., Mohkam M., et al. The inhibition effect of *Lactobacilli* against growth and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2018;10(1):34–42. DOI: https://doi.org/10.1007/s12602-017-9267-9
23. Liu Y., Wu L., Yan Y., et al. Lactic acid and peroxyacetic acid inhibit biofilm of *Escherichia coli* O157:H7 formed in beef extract. *Foodborne Pathog Dis*. 2021;18(10):744–51. DOI: https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0012
24. Sycheva M.V., Popova L.P., Pashkova T.M., et al. Genomic sequence of the strain *Enterococcus faecium* ICIS 18. *Microbiol. Resour. Announc*. 2020;9(2):e01349–19. DOI: https://doi.org/10.1128/mra.01349-19
25. Pang X., Song X., Chen M., et al. Combating biofilms of foodborne pathogens with bacteriocins by lactic acid bacteria in the food industry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2022;21(2):1657–76. DOI: https://doi.org/10.1111/1541-4337.12922
26. Nwoko E.Q.A., Okeke I.N. Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. *Biochem. Soc. Trans*. 2021;49(3):1147–57. DOI: https://doi.org/10.1042/bst20200718
27. Veljović K., Popović N., Miljković M., et al. Novel aggregation promoting factor AggE contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGGO9-28. *Front. Microbiol*. 2017;8:1843. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01843
28. Леонова М.В. Пробиотики в лечении вагинальных инфекций: эффективность с позиции доказательной медицины. *Медицинский совет*. 2020;(13):148–54. Leonova M.V. Probiotics in the treatment of vaginal infections: efficacy from the perspective of evidence-based medicine. *Medical Council*. 2020;(13):148–54. DOI: https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-13-148-154 EDN: https://elibrary.ru/cocsob
29. Хакимова Л.Р., Потапова С.М., Ахметова Л.Р., Гимранова И.А. Изучение биологических свойств аутоштаммов *Lactobacillus* spp. для создания пробиотиков. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023;68(8):480–8. Khakimova L.R., Potapova S.M., Ahmetova L.R., Gimranova I.A. Study of biological properties of *Lactobacillus* spp. To create probiotics. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2023;68(8):480–8. DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-480-488 EDN: https://elibrary.ru/ppirvw
30. Prakash V., Madhavan A., Veedu A.P., et al. Harnessing the probiotic properties and immunomodulatory effects of fermented food-derived *Limosilactobacillus fermentum* strains: implications for environmental enteropathy. *Front. Nutr*. 2023;10:1200926. DOI: https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1200926

Информация об авторах

Пашинина Ольга Александровна✉ — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза — обособленного структурного подразделения Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, olga25mikro@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9944-3095

Пашкова Татьяна Михайловна — д-р биол. наук, в. н. с. лаб. персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза — обособленного структурного подразделения Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, pashkova070782@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8075-8249

Сычева Мария Викторовна — д-р биол. наук, профессор, с. н. с. лаб. персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза — обособленного структурного подразделения Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, sycheva_maria@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-1455-1631

Попова Лидия Петровна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза — обособленного структурного подразделения Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, ploomy@list.ru, https://orcid.org/0000-0002-3766-6020

Карташова Ольга Львовна — д-р биол. наук, доцент, в. н. с. лаб. персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза — обособленного структурного подразделения Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, labpersist@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1487-7546

Участие авторов: *Пашинина О.А., Пашкова Т.М., Сычева М.В.* — сбор и обработка материала, написание текста, научное редактирование; *Попова Л.П.* — сбор и обработка материала; *Карташова О.Л.* — концепция и дизайн исследования, написание текста, научное 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 25.09.2024;
принята к публикации 04.12.2024;
опубликована 30.01.2025

Information about the authors

Olga A. Pashinina✉ — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of microbial persistence and symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis — a separate structural unit of the Orenburg Federal Research Center, Orenburg, Russia, olga25mikro@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9944-3095

Tatiana M. Pashkova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of microbial persistence and symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis — a separate structural unit of the Orenburg Federal Research Center, Orenburg, Russia, pashkova070782@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8075-8249

Maria V. Sycheva — D. Sci. (Biol.), Professor, senior researcher, Laboratory of microbial persistence and symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis — a separate structural unit of the Orenburg Federal Research Center, Orenburg, Russia, sycheva_maria@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-1455-1631

Lidia P. Popova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of microbial persistence and symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis — a separate structural unit of the Orenburg Federal Research Center, Orenburg, Russia, ploomy@list.ru, https://orcid.org/0000-0002-3766-6020

Olga L. Kartashova — D. Sci. (Biol.), Associate Professor, leading researcher, Laboratory of microbial persistence and symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis — a separate structural unit of the Orenburg Federal Research Center, Orenburg, Russia, labpersist@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1487-7546

Authors' contribution: *Pashinina O.A., Pashkova T.M.*, *Sycheva M.V.* — collection and processing of material, text writing and science editing; *Popova L.P.* — collection and processing of material; *Kartashova O.L.* — study concept and design, text writing and 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 25.09.2024;
accepted for publication 04.12.2024;
published 30.01.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-481

Интенсивность дегрануляции и лизиса гранулоцитов крови человека при взаимодействии с *Yersinia pestis* на модели бактериемии *ex vivo*

Кравцов А.Л.✉, Бугоркова С.А., Клюева С.Н., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Аннотация

Введение. С учётом решающей роли антибактериальных стратегий секреторной дегрануляции и нетоза в предотвращении сепсиса, представляет интерес изучение взаимодействия *Yersinia pestis* с гранулоцитами крови человека на модели бактериемии *ex vivo* для оценки эффективности этих стратегий при чуме.

Цель работы — оценка дегрануляции и лизиса гранулоцитов в образцах цельной крови человека в присутствии живых *Y. pestis.*

Материалы и методы. Бактериемию моделировали добавлением в цельную кровь (с гепарином) клеток аттенуированного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при 37°С либо 28°С, в дозе 10^8 м.к./мл. Штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) и *Escherichia coli* ATCC 25922 использовали в опытах с кровью тех же доноров в качестве положительного контроля. Бактерицидный эффект определяли в различные сроки инкубации крови при 37°С (в течение 6 ч) микробиологическим методом. С помощью проточной цитометрии в крови проводили иммунофенотипирование лейкоцитов по Lyse/No-Wash протоколу для определения экспрессии на поверхности гранулоцитов основного лейкоцитарного антигена CD45 и маркера секреторной азурофильной дегрануляции CD63. Интенсивность лизиса гранулоцитов оценивали по снижению доли этих клеток в суммарной лейкоцитарной популяции.

Результаты. Установлено, что живые клетки чумного микроба, в отличие от *E. coli* и *S. aureus,* не приводят к развитию азурофильной дегрануляции в гранулоцитах крови человека и в течение 6 ч не индуцируют аутолизис (нетоз) этих клеток при моделировании бактериемии *ex vivo*.

Заключение. На модели чумной бактериемии *ex vivo* впервые получена информация, свидетельствующая о том, что в крови не привитых против чумы людей не работают механизмы внеклеточной бактерицидности гранулоцитов, эффективно функционирующие в условиях бактериемии в отношении *E. coli* и *S. aureus.* Подготовлена экспериментально-методическая основа для дальнейших исследований с клетками крови привитых против чумы доноров с целью разработки новых эффективных тестов оценки напряжённости приобретённого клеточного противочумного иммунитета.

Ключевые слова: *Yersinia pestis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, модель бактериемии ex vivo, нейтрофилы, азурофильная дегрануляция нейтрофилов, нетоз, лейкоцитарная эластаза, иммунофенотипирование лейкоцитов, проточная цитометрия*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 9 от 21.10.2020).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР АААА-А21-121012090064-0.

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

Для цитирования: Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Клюева С.Н., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А. Интенсивность дегрануляции и лизиса гранулоцитов крови человека при взаимодействии с *Yersinia pestis* на модели бактериемии *ex vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):80–90.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-481
EDN: https://www.elibrary.ru/OPXPGY

© Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Клюева С.Н., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-481

Human blood granulocyte degranulation and lysis intensity during interaction with *Yersinia pestis* in the *ex vivo* model of bacteriemia

Aleksandr L. Kravtsov✉, Svetlana A. Bugorkova, Svetlana N. Klyueva, Tatyana P. Shmelkova, Vitaly A. Kozhevnikov

Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. Considering the decisive role of antibacterial strategies of secretory degranulation and NETosis in the prevention of sepsis, it is of interest to study the interaction of *Yersinia pestis* with human blood granulocytes using an *ex vivo* bacteremia model to assess the effectiveness of this antibacterial strategy of the host organism in plague.

Purpose: evaluation of granulocyte degranulation and lysis in human whole blood samples in the presence of live *Y. pestis.*

Materials and methods. Bacteremia was modeled by adding *Y. pestis* EV NIIEG cells grown at 37°C or 28°C to whole blood (with heparin) at a dose of 10^8 mc/mL. Strains *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used in experiments with blood from the same donors as a positive control. The bactericidal effect was determined at different time points during blood incubation at 37°C (for 6 hours) using a microbiological method. Using flow cytometry, immunophenotyping of leukocytes was performed in the blood according to the Lyse/No-Wash protocol to determine the expression of the main leukocyte antigen CD45 and the secretory azurophilic degranulation marker CD63 on the surface of the granulocytes. The intensity of granulocyte lysis was assessed by the decrease in the proportion of these cells in the total leukocyte population.

Results. It has been established that live plague microbes, unlike *E. coli* and *S. aureus*, do not cause the development of azurophilic degranulation in human blood granulocytes and do not induce autolysis (NETosis) of these cells within 6 hours when bacteremia is modeled *ex vivo*.

Conclusion. Information was obtained on the ability of the plague microbe to suppress the extracellular bactericidal mechanisms of granulocytes in the blood of people not vaccinated against plague, which effectively function under conditions of bacteremia against *E. coli* and *S. aureus*. An experimental and methodological basis has been prepared for further research with blood cells from donors vaccinated against plague in order to develop new effective tests for assessing the intensity of acquired cellular anti-plague immunity in humans.

Keywords: *Yersinia pestis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, ex vivo bacteremia model, neutrophil, neutrophil azurophilic degranulations, NETosis, leukocyte elastase, leukocyte immunophenotyping, flow cytometry*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” (protocol No. 9, October 21, 2020).

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No AAAA-A21-121012090064-0.

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

For citation: Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Shmelkova T.P., Kozhevnikov V.A. Human blood granulocyte degranulation and lysis intensity during interaction with *Yersinia pestis* in the *ex vivo* model of bacteriemia. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):80–90.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-481
EDN: https://www.elibrary.ru/OPXPGY

Введение

Первичная лёгочная чума (ПЛЧ), вызываемая *Yersinia pestis* и передающаяся человеку воздушно-капельным путём от другого человека или домашнего животного, является самой опасной бактериальной инфекцией, при которой возбудитель эффективно нейтрализует защитные механизмы иммунной системы и интенсивно размножается в организме хозяина, длительное время не индуцируя развития *in vivo* защитной воспалительной реакции. Бессимптомный характер развития инфекционного процесса в течение первых 2 сут после аэрогенного заражения чумой является ключевым фактором, определяющим высокую эпидемическую опасность ПЛЧ [1, 2]. Патогенез чумы недостаточно изучен, особенно на стадии бактериемии [3], когда устойчивые к фагоцитозу клетки *Y. pestis,* внеклеточно размножающиеся в микрокапиллярах печени, лёгких и других органов, вступают *in vivo* в длительное контактное взаимодействие с лейкоцитами перифе-

© Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Shmelkova T.P., Kozhevnikov V.A., 2025

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-481

рической крови, в том числе с нейтрофильными гранулоцитами (НГ), ответственными за развитие воспалительных реакций [4].

Тем не менее в опытах на лабораторных животных установлена важная особенность патогенетического механизма при ПЛЧ, которая заключается в полном подавлении на ранней стадии инфекции необходимых для развития воспаления процессов секреторной азурофильной дегрануляции [5], хемотаксиса [6], апоптоза [7] и лизиса НГ [8] эффекторными Yop-белками (*Yersinia* outer proteins), синтезируемыми *Y. pestis* при температуре 37°С и секретируемыми внеклеточно размножающимися чумными микробами в цитоплазму клеток иммунной системы организма хозяина [4, 9]. При этом Yop-белки вирулентности *Y. pestis*, наоборот, запускают гибель макрофагов по типу апоптоза, что нарушает функционирование *in vivo* механизма эфероцитоза и неизбежно приводит к генерализации воспалительного процесса в результате массивного аутолизиса неспособных реализовать свой бактерицидный потенциал НГ периферической крови. Аутолизис гранулоцитов, быстро запускаемый с отсрочкой по времени сразу во всём организме, приводит, согласно гипотезе M.T. Silva [10], к высвобождению в плазму крови огромного количества молекул лейкоцитарной эластазы (ЛЭ), разрушающей эластин лёгких и кровеносных сосудов, а также расщепляющей клеточные рецепторы и белки плазмы, ответственные за регуляцию процесса коагуляции, что является триггером неожиданного и молниеносного развития сепсиса при ПЛЧ.

Для подтверждения (или опровержения) данной гипотезы требуется детальное изучение процессов дегрануляции и лизиса гранулоцитов крови человека и животных с использованием современных методов цитологического анализа в условиях моделирования чумной бактериемии *ex vivo.* Как свидетельствуют результаты изучения патогенеза COVID-19, связанного с выраженным дисбалансом в системе эластаза–ингибиторы [11], в случае выделения НГ из периферической крови пациентов важная информация о роли нетоза в иммунологической защите и в развитии при сепсисе процесса гиперкоагуляции может быть потеряна, т. к. процедура центрифугирования клеток крови в градиенте плотности не позволяет дифференцировать от лимфоцитов и моноцитов склонную к нетозу популяцию активированных НГ низкой плотности с повышенным уровнем экспрессии маркера азурофильной дегрануляции CD63 на клеточной поверхности [12].

Длительное время исследования на модели бактериемии *ex vivo* не проводились, в том числе в опытах с условно-патогенными бактериями [13], т. к. считалось, что гранулоциты крови реализуют свой мощный бактерицидный потенциал только после миграции из сосудистого русла в ткани, где они обезвреживают бактерии с помощью фагоцитоза. Ситуация изменилась после открытия нетоза в 2004 г. и исследований B. McDonald и соавт. [14], экспериментально доказавших, что аутолизис НГ (нетоз), которому предшествует и сопутствует секреторная азурофильная дегрануляция НГ с высвобождением из гранул ЛЭ, позволяет организму обезвреживать микробы на ранней стадии бактериемии (в течение первых 6 ч) непосредственно в потоке крови с помощью ДНК-сетей NETs (Neutrophil Extracellular Traps), «запускаемых» активированными нейтрофилами во внеклеточное пространство. Причём эффективность этого ранее не известного механизма иммунологической защиты с точки зрения предотвращения бактериального сепсиса при инфекциях, вызываемых *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, была в 4 раза выше, чем фагоцитоза.

При особо опасных инфекциях, возбудители которых обладают устойчивостью к перевариванию в макрофагах (например, *Y. pseudotuberculosis*), протеазы и бактерицидные катионные белки, высвобождаемые из НГ в процессе секреторной дегрануляции и цитолиза, частично или полностью обезвреживают устойчивые к фагоцитозу бактерии, которые после такой «предварительной обработки» быстро поглощаются и перевариваются макрофагами [15]. В 2002 г. нами впервые были опубликованы результаты исследований, в которых проточно-цитофлуориметрический метод оценки интенсивности дегрануляции был использован для регистрации различий в способности чумных микробов, выращенных при 28°С и 37°С, запускать *ex vivo* процесс секреторной дегрануляции в фагоцитах цельной крови человека. Для клеток, выращенных при 37°С, был характерен срыв антибактериального реагирования по показателю секреторной дегрануляции на модели чумной бактериемии [16]. Много лет спустя в зарубежной печати стали появляться экспериментальные данные, способные объяснить механизм зарегистрированного нами феномена отсутствия дегрануляции фагоцитов в крови человека, обсеменённой живыми чумными микробами. Исследования проводились *in vivo* на мышах [5, 8] и *in vitro* с НГ, предварительно выделенными из крови человека [17, 18]. Дегрануляция оценивалась, в отличие от нашей работы, не с использованием суправитальной окраски красителем акридиновым оранжевым (АО), а по маркеру дегрануляции CD63. Эксперименты на модели бактериемии *ex vivo* не проводились. Интенсивность лизиса гранулоцитов в крови человека, обсеменённой чумными микробами или условно-патогенными микроорганизмами, к моменту начала нашей работы методом проточной цитометрии не определялась и не контролировалась.

Актуальность продолжения ранее начатых нами исследований на модели бактериемии *ex vivo*

с использованием маркера азурофильной дегрануляции CD63 и других лейкоцитарных фенотипических маркеров определялась необходимостью разработки клеточного теста оценки напряжённости поствакцинального противочумного иммунитета у людей, основанного на количественной оценке показателя повреждения нейтрофилов периферической крови специфическим антигеном. В свете современных представлений стратегия разработки вакцин для экстренной профилактики чумы и других особо опасных инфекций должна учитывать способность иммуностимулирующих препаратов запускать механизм внеклеточной антителозависимой цитотоксичности (бактерицидности) НГ [19], реализуемый в крови при взаимодействии с иммунными комплексами антиген–антитело с помощью процессов секреторной азурофильной дегрануляции и нетоза [20]. Только при появлении в крови специфических антител к антигену, ранее использованному для иммунизации животных, внутривенное введение (или добавление в кровь) этого антигена запускает в организме (или в условиях *ex vivo*) защитную IgG-обусловленную анафилактическую реакцию, связанную с секреторной дегрануляцией и лизисом НГ периферической крови [21]. Молекулярные механизмы, ответственные за переход инфекционного процесса при ПЛЧ из бессимптомной фазы в фазу системного воспаления, мало изучены [3, 22], и один из них может быть связан с запуском *in vivo* IgG-обусловленной аллергической реакции.

Отсутствие местной защитной воспалительной реакции в неиммунном организме хозяина наблюдается не только при заражении дикими вирулентными штаммами *Y. pestis,* но и в ответ на имеющие плазмиду вирулентности непигментированные штаммы, к которым относится вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ ($Pgm^-pFra^+pCad^+pPst^+$) [1, 23]. Обладая остаточной вирулентностью, такие аттенуированные штаммы вызывают гибель лабораторных животных только при внутривенном введении в дозах более 10^6 м.к., что используется в модельных экспериментах по изучению механизмов иммунитета и вирулентности [23].

Целью настоящей работы явилась оценка дегрануляции и лизиса гранулоцитов в образцах цельной крови человека в присутствии живых *Y. pestis*.

Материалы и методы

В исследованиях использовали аттенуированный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, штаммы *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и *E. coli* ATCC 25922 из Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора. Суточные культуры *S. aureus* и *E. coli* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) при 37°C. Для клеток *Y. pestis* EV получали двухсуточную стационарную бактериальную культуру, выращенную на том же агаре при 28°C (*Y.pestis*28). Экспоненциальную 18-часовую культуру *Y. pestis* EV с изменёнными антигенными свойствами получали путем выращивания на бульоне Хоттингера (pH 7,2) с аэрацией при 37°C (*Y.pestis*37) [24]. В стерильном фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) с 0,9% NaCl готовили по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П взвеси живых бактерий с концентрацией 10^9 м.к./мл из культур *E. coli*, *S. aureus*, *Y.pestis*28 и *Y.pestis*37.

В исследовании приняли участие 10 условно здоровых не привитых против чумы доноров (3 мужчин и 7 женщин) в возрасте 25–55 лет, давшие письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 9 от 21.10.2020).

Кровь добровольцев забирали в пробирки с антикоагулянтом (гепарином) и использовали в течение 1–2 ч. Для моделирования бактериемии к 1 мл крови, содержащей в среднем 2×10^6 фагоцитов, добавляли 100 мкл исследуемой миллиардной бактериальной взвеси, что соответствовало концентрации 10^8 м.к./мл крови или исходной микробной нагрузке (число бактерий : фагоцит) в среднем 50 : 1 [25]. С кровью каждого донора взвеси клеток *Y. pestis*28 и *Y.pestis*37 исследовали одновременно с взвесями клеток *E. coli* и/или *S. aureus.* Образцы крови (по 1 мл) с исследуемыми бактериями помещали в шейкер-инкубатор «ES-20» («BioSan») и инкубировали при перемешивании в течение 6 ч. Контролем служили образцы, инкубируемые в течение 6 ч без бактерий, с добавлением 100 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера на 1 мл крови.

Иммунофенотипирование лейкоцитов в исследуемых образцах крови для проточно-цитофлуориметрического анализа осуществляли по протоколу Lyse/No-Wash [26] с использованием меченых мышиных моноклональных антител к антигенам лейкоцитов крови человека CD45-FITC и CD63-PE («Bekman Coulter»). Гранулоциты идентифицировали по степени их внутриклеточной гранулярности (интенсивности бокового светорассеяния) и по экспрессии общего лейкоцитарного антигена (CD45). В гейте гранулоцитов определяли относительное содержание клеток, положительных по экспрессии поверхностного маркера азурофильной дегрануляции CD63 [5, 17]. Результаты учитывали для каждого опытного и контрольного образца крови в динамике: через 0, 1, 2, 4, 6 ч инкубации.

Суммарное количество в крови живых бактерий (в плазме и внутри активных фагоцитов) определяли микробиологическим методом, основанным на осмотическом лизисе клеток крови в дистиллированной воде [27]. К 1 мл H_2O добавляли 10 мкл крови. Через 30 с из разведённой водой плазмы,

содержащей бактерии и продукты лизиса клеток крови, готовили в фосфатно-солевом буфере последовательные 10-кратные разведения для высева на чашки с агаром Хоттингера (pH 7,2). Для каждого из разведений число колоний (КОЕ) стафилококка или кишечной палочки подсчитывали через сутки роста при температуре 37°С, а клеток *Y. pestis* — на 3-и сутки роста при 28°С. По отношению к числу КОЕ через 0 ч инкубации, принятому за 100%, оценивали выживаемость бактерий каждого вида в крови (в %) через 1, 2 и 6 ч инкубации для сравнительной характеристики развития бактерицидного эффекта в условиях *ex vivo* [25].

Интенсивность лизиса гранулоцитов количественно определяли *ex vivo* методом проточной цитометрии по снижению доли этих клеток в образцах цельной периферической крови, а также по увеличению относительного содержания в крови клеточного дебриса [25].

Для оценки показателей светорассеяния и интенсивности иммунофлуоресценции меченных CD-маркерами лейкоцитов крови использовали проточный цитометр «DakoCytomation» («Dako») с программным обеспечением «Summit v.4.3 Built 2445».

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»), представляя результаты в виде медианы (Me) и квартильных отклонений [Q_1; Q_3] с расчётом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна–Уитни. Значение $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты

При добавлении в кровь *Y.pestis*37 в течение 6 ч в гранулоцитах отсутствовали изменения, связанные с состоянием цитоплазматических гранул, а также лизис этих клеток в условиях моделирования *ex vivo* чумной бактериемии, в то время как в крови тех же доноров условно-патогенные бактерии индуцировали к 6 ч инкубации интенсивную дегрануляцию и неизбежный лизис подавляющего большинства гранулоцитов в суммарной популяции лейкоцитов периферической крови. Антибактериальное реагирование гранулоцитов по исследуемым показателям дегрануляции и цитолиза имело место в случае моделирования бактериемии *ex vivo* клетками *Y.pestis*28. Однако, в сравнении с реакцией на *E. coli* или *S. aureus*, это реагирование было значительно менее интенсивным (**таблица**).

Регистрируемые различия по исследуемым показателям наглядно иллюстрируют на примере

Результаты сравнительной оценки интенсивности азурофильной дегрануляции и лизиса гранулоцитов при моделировании бактериемии *ex vivo* живыми клетками *E. coli, S. aureus* и *Y.pestis*37 в зависимости от срока инкубации крови при 37°С, Me [Q_1; Q_3]

The results of granulocyte azurophilic degranulation and lysis intensity estimation in an *ex vivo* modeling of bacteremia by live *E. coli, S. aureus* and *Y.pestis*37 in depending of blood incubation time at 37°C, Me [Q_1; Q_3]

Показатель Parameter	Образец крови Blood sample	Срок инкубации, мин | Duration of incubation, min			
		60	120	240	360
Интенсивность лизиса гранулоцитов,% Granulocyte lysis intensity, %	Контроль Control	5,2 [3,8; 7,4]	9,1 [8,6; 11,8]	12,2 [10,5; 13,7]	14,6 [12,1; 16,8]
	S. aureus	27 [25,4; 29,6]*	56,0 [51,2; 59,7]*	78 [73,6; 82,5]*	82,0 [76,8; 85,2]*
	E. coli	22,3 [20,7; 24,5]*	38,8 [37,3; 40,5]*	63,6 [56,5; 70,4]*	78,6 [73,4; 84,7]*
	*Y.pestis*28	7,3 [6,2; 9,1]	10,4 [8,7; 13,5]	20,6 [18,6; 21,5]*	19,0 [17,5; 20,8]*
	*Y.pestis*37	6,7 [4,3; 8,6]	8,0 [6,2; 9,5]	9,3 [6,7; 12,8]	10,6 [6,8; 13,0]
Доля гранулоцитов с $CD63^+$-фенотипом, % Share of granulocytes with $CD63^+$ phenotype, %	Контроль Control	10 [9,2; 13,8]	14 [11,4; 16,3]	17 [15,5; 19,7]	18 [16,3; 21,4]
	S. aureus	35 [34,5; 35,7]*	70 [67,0; 72,4]*	83 [74,5; 93,0]*	79 [68,4; 90,2]*
	E. coli	28,3 [25,6; 32,4]*	50,3 [44,6; 55,3]*	70,6 [61,0; 75,7]*	80[72,2; 88,2]*
	*Y.pestis*28	19,7 [17,8; 23,5]*	26,0 [21,1; 30,2]*	32,3 [28,4; 36,6]*	31,2 [22,2; 38,7]*
	*Y.pestis*37	14,2 [11,9; 18,3]	13,4 [10,6; 17,3]	15,1 [13,2; 18,6]	20,8 [16,5; 22,7]

Примечание. *$p < 0,05$ по сравнению с контролем.
Note. *$p < 0.05$ compared with control.

*Y.pestis*37 и *E. coli* характерные цитограммы, представленные на **рис. 1**, где гранулоциты локализуются по степени внутриклеточной гранулярности (интенсивности бокового светорассеяния) и плотности экспрессии CD45 в выделенном в виде эллипса регионе R3 при автоматическом дифференцировании их в контрольных образцах крови от лимфоцитов и моноцитов. В присутствии *E. coli* доля гранулоцитов (клеток в регионе R3) снижалась через 6 ч в суммарной лейкоцитарной популяции относительно контрольного показателя в 10 раз — с 47,1 до 4,8%, а в присутствии *Y.pestis*37 фактически не менялась, оставаясь близкой к контролю (43,8%). В крови, обсеменённой *E. coli,* доля гранулоцитов резко снижалась в этот срок из-за массивного лизиса погибших фагоцитов, существенно увеличивающего относительное количество сигналов от клеточного дебриса, регистрируемых за пределами региона R1. На цитограмме опытного образца крови с клетками *Y.pestis*37 доля дебриса через 6 ч инкубации была, наоборот, ниже, чем в контроле без бактерий.

В отличие от условно-патогенных бактерий, клетки *Y.pestis*37 не индуцировали *ex vivo* повышение экспрессии на поверхности гранулоцитов лизосомального белка CD63 (тетраспанина), являющегося маркером развития секреторной азурофильной дегрануляции (**рис. 2**). В образцах крови, обсеменённых живыми клетками *E. coli* и *S. aureus,* процесс секреции CD63 из гранул на поверхность гранулоцитов запускался уже через час, существенно активировался по интенсивности с 2 ч инкубации и предшествовал лизису активированных гранулоцитов в условиях *ex vivo* (таблица).

На фоне отсутствия антибактериального реагирования гранулоцитов по исследуемым показателям дегрануляции и лейкоцитолиза регистрировали микробиологическим методом повышенную выживаемость *Y.pestis*37 в образцах цельной крови человека в сравнении с *Y.pestis*28. Чумной микроб, выращенный при температуре организма хозяина, начинал через 6 ч интенсивно размножаться в условиях моделирования бактериемии *ex vivo*. В крови

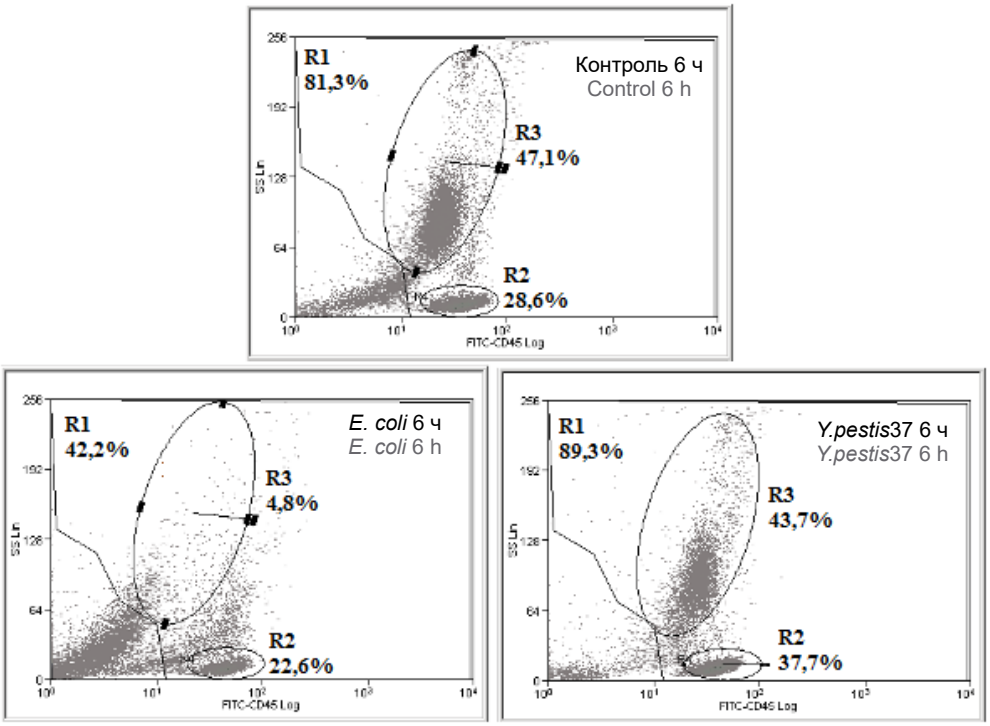


Рис. 1. Цитограммы распределения лейкоцитов по степени внутриклеточной гранулярности и плотности экспрессии на клеточной поверхности общего лейкоцитарного антигена CD45 через 6 ч после добавления в кровь одного и того же донора клеток *Y. pestis* и *E. coli*.

На контрольной цитограмме регионы R3 и R2 соответствуют гранулоцитам и лимфоцитам. Моноциты локализуются в области между регионами R2 и R3. Все целые неповреждённые лейкоциты учитывались цитометром в области R1, за пределами которой аккумулировались сигналы от клеточного дебриса — продуктов распада лейкоцитов с низким уровнем экспрессии лейкоцитарного антигена. Доля клеток в каждом регионе выражена в процентах от общего числа зарегистрированных лейкоцитов. Доля дебриса соответствует (100 – R1)%.

Fig. 1. Cytograms of the blood leukocyte distribution according to the degree of intracellular granularity and the cell surface common leukocyte antigen CD45 expression density at 6 h after the addition of *Y. pestis* and *E. coli* to the blood of the same donor.

Regions R3 and R2 correspond to granulocytes and lymphocytes. Monocytes are localized in the area between the R2 and R3 regions. All intact undamaged leukocytes were counted by the cytometer in the R1 region, beyond which signals from cellular debris, products of the breakdown of leukocytes with a low level of leukocyte antigen expression, accumulated. The proportion of cells in each region is expressed as a percentage of the total number of registered leukocytes. The proportion of debris corresponds to (100 – R1)%.

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-481

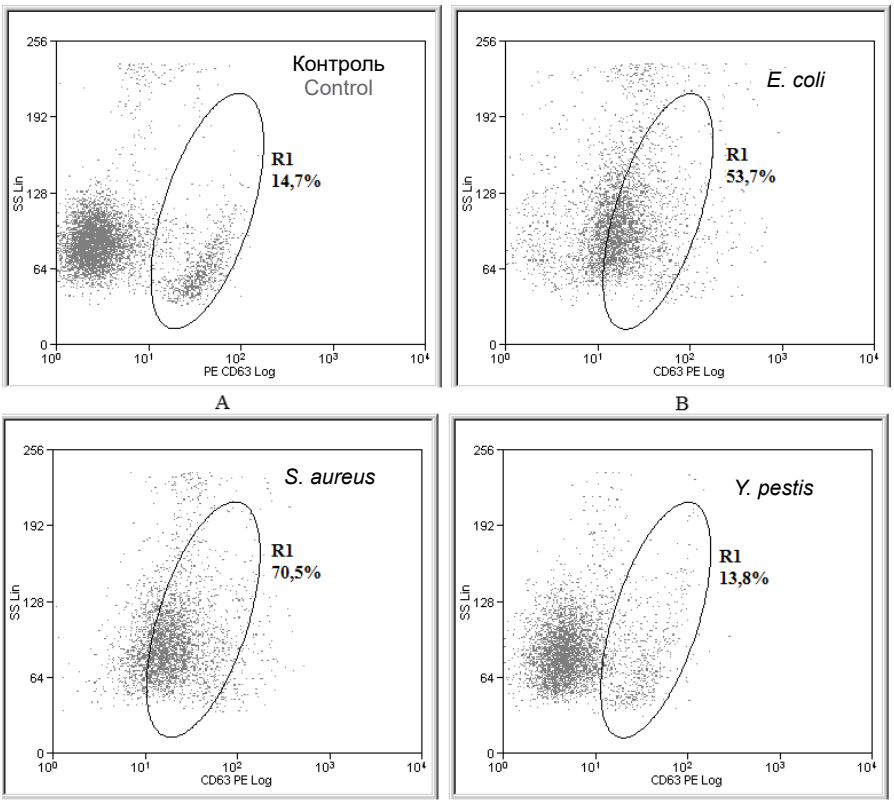


Рис. 2. Относительное содержание в гейте гранулоцитов активированных клеток с CD63⁺-фенотипом через 2 ч взаимодействия *ex vivo* с живыми клетками *Y.pestis* 37, *E. coli* и *S. aureus*.

CD63⁺-гранулоциты локализуются на цитограммах в области R1; контроль — кровь через 2 ч без бактерий. Доля клеток в регионе R1 представлена как процент от общего числа клеток, зарегистрированных в гейте гранулоцитов.

Fig. 2. Relative content of activated cells with CD63⁺ phenotype in the granulocyte gate after 2 h of *ex vivo* interaction with living cells of *Y.pestis*37, *E. coli* and *S. aureus*.

CD63⁺ granulocytes are localized in the R1 region of cytograms; control is the blood after 2 h without bacteria. The proportion of cells in R1 region is expressed as a percentage of the total number of registered granulocytes.

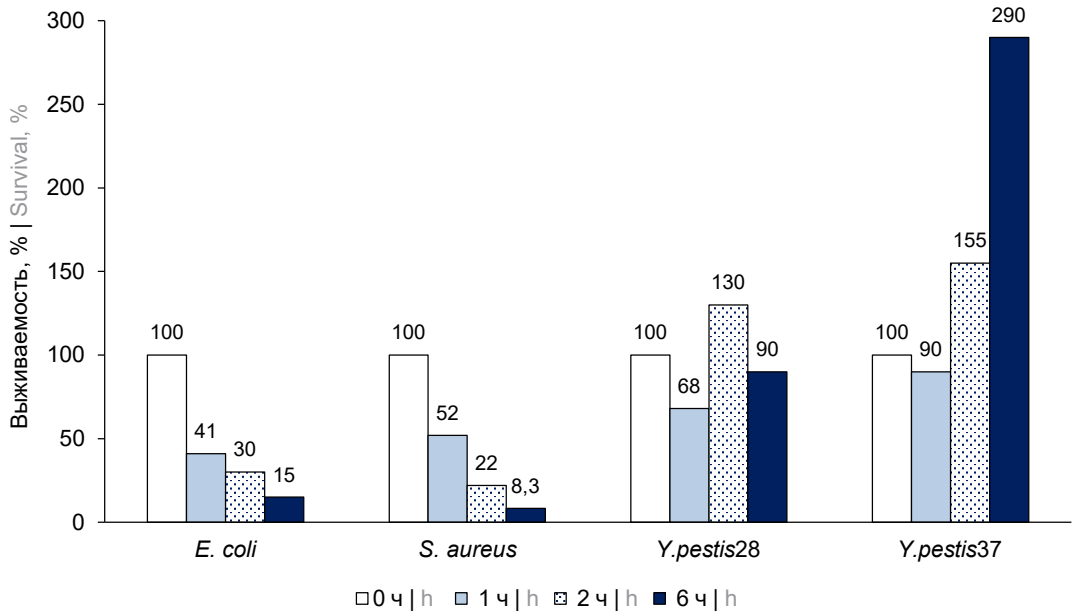


Рис. 3. Повышенная выживаемость *Y.pestis*37 в крови человека в сравнении с *E. coli, S. aureus* и *Y.pestis*28 при моделировании бактериемии в условиях *ex vivo.*

Fig. 3. Increased survival of *Y.pestis*37 in human blood compared to *E. coli, S. aureus* and *Y.pestis*28 in an *ex vivo* bacteremia model.

тех же доноров условно-патогенные бактерии быстро погибали под влиянием бактерицидного эффекта активных фагоцитов. Выживаемость *E. coli* и *S. aureus* снижалась к 6 ч с момента моделирования бактериемии не менее чем на 80% (**рис. 3**).

Обсуждение

При выполнении настоящей работы методом проточной цитометрии впервые получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что Lyse/NoWash процедура иммунофенотипирования лейкоцитов крови с использованием меченных флуорохромами CD-маркеров, исключающая клеточные потери и воздействие на клетки процесса центрифугирования [26], позволяет быстро оценивать в образцах цельной крови человека как интенсивность процесса секреторной дегрануляции, так и запускаемого инфекционным агентом *ex vivo* аутолизиса гранулоцитов на начальной стадии моделирования бактериемии. Благодаря экспериментам с *E. coli* и *S. aureus* получена новая информация, подтверждающая на модели клеток человека ранее установленное в опытах на животных [14] значение быстрого развития в крови процессов дегрануляции и аутолизиса гранулоцитов для киллинга этих бактерий в условиях бактериемии. Зарегистрированная в работе неспособность интенсивно размножающихся в крови клеток *Y.pestis*37 запускать функциональную активацию гранулоцитов по показателям секреторной дегрануляции и цитолиза важна для понимания причин бессимптомного развития инфекционного процесса при ПЛЧ [10, 22]. Результаты микробиологических исследований, полученные одновременно с данными цитофлуориметрического анализа на модели *ex vivo*, возможно, помогут объяснить, почему бактериемия при чуме, в отличие от стафилококковой бактериемии, всегда неизбежно приводит к сепсису.

Клетки *Y.pestis*37, размножаясь в крови человека при температуре 37°С, не запускали процесс секреции лизосомального белка тетраспанина (CD63) из первичных гранул гранулоцитов на клеточную поверхность, что согласуется с результатами исследований K.R. Eichelberger и соавт., проведённых *in vivo* на лабораторных животных [5] и *in vitro* на модели НГ, предварительно выделенных из крови человека [17]. В связи с этим важное значение может иметь тот факт, что белок CD63 вовлечён в процесс секреции из тех же гранул ЛЭ [28], которая является общепризнанным биохимическим маркером воспалительного процесса [29] и ключевым белком врождённой антибактериальной защиты, ответственным за быстрое избирательное расщепление в очаге инфекционного воспаления факторов вирулентности *Yersinia* spp. и других энтеробактерий [30].

Для киллинга бактерий в плазме крови и других биологических жидкостях эта протеаза образует из неактивных лизосомальных белков-предшественников в процессе дегрануляции антибактериальные пептиды со свойствами антибиотиков широкого спектра действия [31]. Расщепляя гистоны в ядрах активированных нейтрофилов, ЛЭ запускает и регулирует, совместно с миелопероксидазой, процесс деконденсации ядерного хроматина при нетозе, при котором аутолизису НГ сопутствует высвобождение в кровь и ткани организма ДНК-сетей NETs с адсорбированными в них продуктами распада НГ, обладающими выраженными бактерицидными свойствами (ЛЭ и миелопероксидаза, гистоны, антибактериальные пептиды и др.) [32].

Представленную в таблице информацию об интенсивности азурофильной дегрануляции *ex vivo* по маркеру CD63 подтверждают результаты ранее проведённых нами исследований, в которых дегрануляция фагоцитов оценивалась с помощью суправитальной окраски клеток красителем АО [16] и жизнеспособность гранулоцитов в крови с клетками *Y. pestis* и *S. aureus* контролировалась методом проточной цитометрии путём идентифицирования и подсчёта числа погибших диплоидных клеток с пониженным (менее 2С) содержанием ДНК [24, 33]. Гранулоциты крови, как известно, в значительно большем количестве, чем лимфоциты и моноциты, аккумулируют краситель АО в виде его положительно заряженной формы АОН+, которая образуется и накапливается в гранулах живых клеток в процессе непрерывного перекачивании протонов Н+ через неповреждённые мембраны лизосом [34]. Уровень аккумуляции АО в азурофильных гранулах зависит от количества в них молекул ЛЭ, и в процессе дегрануляции ЛЭ высвобождается из гранул во внеклеточное пространство вместе с молекулами АО [35]. В крови, обсеменённой живыми клетками *S. aureus*, гранулоциты утрачивали исходно интенсивную красную флуоресценцию своих гранул в интервале от 3 до 4 ч инкубации. Сохранение интенсивной флуоресценции гранулоцитов при анализе образцов крови, обсеменённых живыми клетками *Y.pestis*37, свидетельствовало об отсутствии в фагоцитах дегрануляции на ранней стадии моделирования *ex vivo* чумной бактериемии, о стабильности в течение 6 ч мембран азурофильных гранул в сохраняющих свою жизнеспособность гранулоцитах периферической крови [16].

В исследовании S.C. Dudte и соавт., в котором дегрануляцию выделенных из крови НГ человека оценивали *in vitro* при взаимодействии с *Y. pestis* и *S. aureus* как по экспрессии CD63, так и по экспрессии ЛЭ на клеточной поверхности, только живой стафилококк индуцировал *in vitro* интенсивную дегрануляцию [18]. Наши данные, полученные в опытах с аттенуированным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ на модели бактериемии *ex vivo*, согласуются с выводами S.C. Dudte и соавт. Однако используемая нами модель была более информативной, т. к. по-

зволяла дополнительно оценивать в крови методом проточной цитометрии интенсивность лейкоцитолиза.

Более низкое содержание клеточного дебриса, зарегистрированное нами в крови с клетками *Y. pestis* через 6 ч инкубации, в сравнении с контрольными образцами крови без бактерий, можно объяснить известной из опытов на животных способностью *Y.pestis*37 подавлять на ранней стадии инфекции спонтанный апоптоз и лизис клеток гранулоцитарной популяции [7, 8, 10].

Причину интенсивного размножения и быстрого распространения *Y. pestis* в организме хозяина объясняют изменением структуры его липополисахарида (ЛПС) при повышении температуры от 28°С до 37°С. Считается, что при ПЛЧ *Y. pestis* не индуцирует в организме защитную воспалительную реакцию вследствие неспособности его структурно изменённого ЛПС стимулировать TLR4 клеток врождённого иммунитета [36]. Такое объяснение не противоречит результатам наших исследований, т. к. ЛПС грамотрицательных бактерий является мощным индуктором секреторной дегрануляции НГ с высвобождением CD63 и ЛЭ на поверхность клеток и во внеклеточное пространство [37]. Однако для активации TLR4, как оказалось, необходим протеолитический эффект высвобождаемой из гранул фагоцитов ЛЭ, от которого зависит способность этого рецептора реагировать на присутствие ЛПС в условиях *in vivo* [22]. При длительном контакте организма с ЛПС (при многократном внутривенном введении малых доз в течение нескольких дней) у мышей формируется, как известно, толерантность к высоким дозам эндотоксина. Нейтрофилы толерантных животных более эффективно обезвреживали патогенные бактерии за счёт «включения» *in vivo* дополнительного механизма антибактериальной защиты (нетоза), который в организме интактных животных не функционировал [38]. Аналогичный эффект оказывала на мышей, по нашим данным, живая чумная вакцина, формирующая напряжённый поствакцинальный противочумный иммунитет у животных этого вида [39].

В настоящей работе не приводятся экспериментальные данные по идентификации и определению содержания в крови НГ по их специфическому фенотипическому маркеру CD16 (рецептору $Fc_{\gamma}RIIIb$), чтобы не усложнять её описание. Поскольку доля НГ в суммарных популяции гранулоцитов крови в исследуемых нами образцах была более 90% [25] и соответствовала клинически установленным нормальным значениям этого показателя [12], мы допускаем в своей работе возможность называть при обсуждении полученных экспериментальных данных суммарную популяцию гранулоцитов НГ.

Метод проточной цитометрии позволяет, как известно, дифференцировать IgG-зависимую анафилаксию, связанную с активацией секреторной функции нейтрофилов периферической крови, от IgE-обусловленной анафилактической реакции, развивающейся в результате стимуляции тучных клеток и базофилов [40]. Не исключено, что при появлении в крови функционально активных IgG-антител к специфическим антигенам *Y. pestis* будет «включаться» механизм внеклеточной антителозависимой цитотоксичности НГ, который можно будет регистрировать методом проточной цитометрии на модели *ex vivo* по показателям интенсивности дегрануляции и лизиса гранулоцитов периферической крови. Такой анализ может быть более чувствительным и информативным, чем в случаях, когда альтернативный кожной пробе показатель повреждения нейтрофилов субъективно оценивается на практике в образцах цельной крови человека с помощью длительного и трудоёмкого метода микроскопического анализа.

Заключение

При изучении процессов дегрануляции и лизиса гранулоцитов в образцах цельной крови человека, обсеменённых живыми *Y. pestis*, получена с помощью CD-маркеров и проточной цитометрии новая информация, свидетельствующая о том, что в крови не привитых против чумы людей не работают на ранней стадии бактериемии механизмы внеклеточной бактерицидности гранулоцитов, эффективно функционирующие в отношении *E. coli* и *S. aureus*. При моделировании бактериемии *ex vivo* с использованием аттенуированного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ создана необходимая экспериментально-методическая основа для дальнейшего изучения процессов дегрануляции и лизиса НГ в образцах крови привитых против чумы людей для разработки новых, более эффективных тестов оценки напряжённости приобретённого клеточного противочумного иммунитета.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Домарадский И.В. Очерки патогенеза чумы. М.;1966. Domaradskiy I.V. *Essays on the Pathogenesis of Plague.* Moscow;1966.
2. Lathem W.W., Crosby S.D., Miller V.L., Goldman W.E. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102(49):17786–91. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0506840102
3. Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):33–40. Podladchikova O.N. Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):33–40. DOI: https://doi.org./10.21055/0370-1069-2017-3-33-40 EDN: https://elibrary.ru/zhgvxr
4. Silva M.T., Silva Pestana N.T. The in vivo extracellular life of intracellular parasites: role in pathogenesis. *Immunobiology*. 2013;18(3):325–37. DOI: https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.011

5. Eichelberger K.R., Jones G.S., Goldman W.E. Inhibition of neutrophil primary granule release during *Yersinia pestis* pulmonary infection. *mBio*. 2019;10(6):e02759-19. DOI: https://doi.org/10.1128/mBio.02759-19
6. Eisele N., Lee-Lewis H., Besch-Williford C., et al. Chemokine receptor CXCR2 mediates bacterial clearance rather than neutrophil recruitment in a murine model of pneumonic plague. *Am. J. Pathol*. 2011;178(3):1190–200. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.067
7. Spinner J.L., Seo K.S., O'Loughlin J.L., et al. Neutrophils are resistant to Yersinia YopJ/P-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the Type III secretion system. *PLoS One*. 2010;5(2):e9279. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009279
8. Stasulli N.M., Eichelberger K.R., Price P.A., et al. Spatially distinct neutrophil responses within the inflammatory lesions of pneumonic plague. *mBio*. 2015;6(5):e01530-15. DOI: https://doi.org/10.1128/mBio.01530-15
9. Spinner J.L., Cundiff J.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun*. 2008;76(8):3754–60. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI. 000385-08
10. Silva M.T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leukoc. Biology*. 2010;88(5):885–96. DOI: https://doi.org/10.1189/jlb.0410205
11. Zerimech F., Jourdain M., Ouraed B., et al. Protease-antiprotease imbalance in patients with severe COVID-19. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2021;59(8):e330–4. DOI: https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0137
12. Morrissay S., Geller A.E., Hu X., et al. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *JCI Insight.* 2021;6(9):e148435. DOI: https://doi.org/10.1172/jci.insight.148435
13. Zwack E.E., Chen Z., Delvin J.C., et al. *Staphylococcus aureus* induces a muted host response in human blood that blunts the recruitment of neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022;119(31): e2123017119. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2123017119
14. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):324–33. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.011
15. Исачкова Л.М., Плехова Н.Г. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2002;(1):11–5. Isachkova L.M., Plekhova N.G. To the development of ideas about anti-infective resistance. *Epidemiology and Infectious Diseases.* 2002;(1):11–5.
16. Kravtsov A.L., Bolyleva E.V., Grabenyukova T.P., et al. Flow microfluorometric analysis of phagocyte degranulation in bacteria infected whole blood cell cultures. In: *Proceedings of Saratov Fall Meeting 2001: Optical Technologies in Biophysics and Medicine. Volume 4707.* Saratov;2002:395–402. DOI: https://doi.org/10.1117/12.475607
17. Eichelberger K.R., Goldman W.E. Human neutrophil isolation and degranulation responses to *Yersinia pestis* infection. In: Vadyvaloo V., Lawreuz M., eds. *Pathogenic Yersinia. Methods in Molecular Biology.* New York;2019:197–209. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9541-7
18. Dudte S.C., Hinnebusch B.J., Shannon J.G. Characterization of *Yersinia pestis* interactions with human neutrophils *in vitro*. *Front. Cell. Infect. Microbiology*. 2017;7:358–65. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00358
19. Gal Y., Marcus H., Mamroud E., Aloni-Grinstein R. Mind the gap — a perspective on strategies for protecting against bacterial infections during the period from infection to eradication. *Microorganisms.* 2023;11(7):1701. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms11071701
20. Granger V., Peyneau M., Chollet-Martin S., de Chaisemartin L. Neutrophil extracellular traps in autoimmunity and allergy: immune complexes at work. *Front. Immunol.* 2019;10:2824. DOI: https://doi.org/10. 3389/fimmu.2019.02824
21. Jönsson F., Mancardi D.A., Albanesi M., Bruhns P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J. Leukoc. Biol*. 2013;94(4):643–54. DOI: https://doi.org/10.1189/jlb.1212623
22. Tang A.H., Brunn G.J., Cascalho M., Platt J.L. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis and related conditions. *J. Leukoc. Biol*. 2007;82(2):282–5. DOI: https://doi.org/10.1189/jlb.1206752
23. Lee-Lewis H., Anderson D. Absence of inflammation and pneumonia during infection with non-pigmented *Yersinia pestis* reveals new role for the pgm locus in pathogenesis. *Infect. Immun*. 2010;78(1):220–30. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.00559-09
24. Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Щуковская Т.Н. и др. Влияние биологических свойств чумного микроба на развитие апоптоза лейкоцитов крови человека в системе *in vitro*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2007;(1):85–9. Shmelkova T.P., Kravtsov A.L., Shchukovskaya T.N., et al. Effects of *Yersinia pestis* biologic characteristics on the development of human human blood leukocyte apoptosis in the *in vitro* system. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2007;(1):85–9. EDN: https://elibrary.ru/icabrv
25. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Клюева С.Н. и др. Оценка изменений фенотипа, интенсивности дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов при моделировании *ex vivo* стафилококковой бактериемии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):293–305. Kravtsov A.L., Bugorkova C.A., Klyueva S.N., et al. Assessment of changes in the phenotype, intensity of degranulation, death and lysis of neutrophils in *ex vivo* modeling of Staphylococcal bacteriemia. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(4):293–305. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-384 EDN: https://elibrary.ru/qgughr
26. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., et al. Standartization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One.* 2019;14(5):e0217163. DOI: https://doi.org/10.1371/journal pone.0217163
27. Bassøe C.F., Solberg C.O. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human leukocytes: quantitation by a flow cytometric and a microbiological method. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.* 1984;92(1):43–50. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1984.tb00050.x
28. Källquist L., Hansson M., Persson A.M., et al. The tetraspanin CD63 is involved in granule targeting of neutrophil elastase. *Blood*. 2008;112(8):3444–54. DOI: https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-116285
29. Zeng W., Song Y., Wong R., et al. Neutrophil elastase: From mechanisms to therapeutic potential. *J. Pharm. Anal*. 2023;13(4):335–66. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.12.003
30. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D., et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 2002;417(6884):91–4. DOI: https://doi.org/10.1038/417091a
31. Shi J., Gantz T. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect. Immunity*. 1998;66(8):3611–7. DOI: https://doi.org/10.1128/iai.66.8.3611-3617.1998
32. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010;191(3):677–91. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.201006052
33. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Bobyleva E.V., et al. Flow cytofluorometric assay of human whole blood leukocyte DNA

degradation in response to *Yersinia pestis* and *Staphylococcus aureus*. In: *Proceedings of Saratov Fall Meeting 2001: Optical Technologies in Biophysics and Medicine. Volume 4241*. Saratov;2001:260–7. DOI: https://doi.org/10.1117/12.431530
34. Traganos F., Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol.* 1994;41:185–94. DOI: https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61717-3
35. Abrams W.R., Diamond L.W., Kane A.B. A flow cytometric assay of neutrophil degranulation. *J. Histochem. Cytochem*. 1983;31(6):737–44. DOI: https://doi.org/10.1177/31.6.6404983
36. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol*. 2006;7(10):1066–73. DOI: https://doi.org/10.1038/ni1386
37. Owen C.A., Campbell M.A., Sunnes P.L., et al. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteases. *J. Cell Biol*. 1995;131(3):775–89. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.131.3.775
38. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., et al. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exp. Immunol*. 2012;168(1):153–63. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x
39. Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А. и др. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек при моделировании чумной инфекции у мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(4):70–4. Kravtsov A.L., Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., et al. Formation of neutrophil extracellular traps when modeling plague infection in mice immunized with *Yersinia pestis* EV NIIEG. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(4):70–4. DOI: https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-4-70-74 EDN: https://elibrary.ru/ovzjoe
40. Khodoun M.V., Strait R., Armstrong L., et al. Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108(30):12413–8. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1105695108

Информация об авторах

Кравцов Александр Леонидович✉ — д-р биол. наук, в. н. с. отд. иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, kravzov195723@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-9016-6578

Бугоркова Светлана Александровна — д-р мед. наук, г. н. с. отд. иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0001-7548-4845

Клюева Светлана Николаевна — канд. биол. наук, н. с. отд. иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, klyueva.cvetlana@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-5550-6063

Шмелькова Татьяна Петровна — канд. биол. наук, с. н. с. отд. образовательных программ и подготовки специалистов Российского противочумного института «Микроб», training@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0001-5891-6028

Кожевников Виталий Александрович — м. н. с. отд. иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, 787868@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7267-7027

Участие авторов: *Кравцов А.Л.* — формулирование идеи, исследовательских целей и задач; написание и редактирование статьи; *Бугоркова С.А.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Клюева С.Н.* — проведение экспериментальных исследований, сбор и статистическая обработка материала; *Шмелькова Т.П.* — микробиологические исследования; *Кожевников В.А.* — проведение цитофлуориметрического анализа. 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 20.12.2024;
принята к публикации 23.02.2025;
опубликована 28.02.2025

Information about the authors

Aleksandr L. Kravtsov✉ — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, kravzov195723@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-9016-6578

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), chief researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0001-7548-4845

Svetlana N. Klyueva — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, klyueva.cvetlana@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-5550-6063

Tatyana P. Shmelkova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of educational programs and specialist training, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, training@microbe.ru, https://orcid.org/0000-0001-5891-6028

Vitaly A. Kozhevnikov — junior researcher, Department of immunology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, 787868@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7267-7027

Authors' contribution: *Kravtsov A.L.* — formulation of the idea, research goals and objectives; writing and editing the article; *Bugorkova S.A.* — study concept and design, editing; *Klyueva S.N.* — conducting experimental studies, collecting and statistically processing the material; *Shmelkova T.P.* — microbiological studies; *Kozhevnikov V.A.* — conducting cytofluorimetric analysis. 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 20.12.2024;
accepted for publication 23.02.2025;
published 28.02.2025

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-578

CC BY

Заболеваемость хроническими вирусными гепатитами и анализ генетического разнообразия вирусов гепатитов B и C среди населения Хабаровска

Котова В.О.[1]✉, Базыкина Е.А.[1], Балахонцева Л.А.[1], Троценко О.Е.[1], Кузнецова А.В.[2]

[1]Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия;
[2]Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Хабаровск, Россия

Аннотация

Введение. Изучение генотипического разнообразия вирусов гепатитов имеет большое значение при проведении анализа эпидемиологической обстановки на конкретной территории, позволяя отслеживать возможные пути передачи инфекции, появление и распространение новых вариантов вирусов.

Цель — оценить динамику заболеваемости хроническими формами вирусных гепатитов B (ХГВ) и C (ХГС) на территории Хабаровского края за 2013–2023 гг., провести анализ генетического разнообразия вирусов гепатитов B (HBV) и C (HCV), циркулирующих в Хабаровске.

Материалы и методы. Ретроспективный анализ заболеваемости ХГВ и ХГС по Хабаровскому краю проведён за 11 лет по данным отчётов Управления Роспотребнадзора по Хабаровскому краю. Выполнен серологический и молекулярно-генетический анализ 112 образцов плазмы крови пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит», проживающих на территории Хабаровска.

Результаты. В Хабаровском крае с 2013 по 2023 г. заболеваемость ХГС снизилась с 50,0 до 44,6 случая на 100 тыс. населения, а ХГВ — с 10,2 до 8,2. ДНК HBV обнаружена в 21 из 36 образцов плазмы крови пациентов с выявленными серологическими маркерами HBV. Среди 17 исследованных образцов генотип D HBV обнаружен в 15 случаях, представленный субгенотипами D1 и D2, субтип A2 — в 2 образцах. Мутаций лекарственной устойчивости не обнаружено. РНК HCV выявлена в 54 из 78 проб плазмы крови с положительным результатом иммуноферментного анализа на наличие антител (IgG + IgM) к HCV. На территории Хабаровска установлена циркуляция субтипов HCV — 1b, 1a, 3a, 2a, 2c с преобладанием субтипа 1b.

Заключение. Заболеваемость ХГС и ХГВ в Хабаровском крае за 11-летний период наблюдения имела ярко выраженную тенденцию убыли. Результаты исследования дополняют существующие представления о циркуляции геновариантов HBV и HCV на территории России.

Ключевые слова: *Хабаровский край, вирус гепатита C, вирус гепатита B, генотип, субтип, хронический гепатит, филогенетический анализ*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии (протокол № 9 от 01.11.2022).

Источник финансирования. Исследование проведено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021–2025 гг. (НИОКТР № 121052600115-4).

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

Для цитирования: Котова В.О., Базыкина Е.А., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е., Кузнецова А.В. Заболеваемость хроническими вирусными гепатитами и анализ генетического разнообразия вирусов гепатитов B и C среди населения Хабаровска. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):91–101.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-578
EDN: https://www.elibrary.ru/zdffei

© Котова В.О., Базыкина Е.А., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е., Кузнецова А.В., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-578

The incidence of chronic viral hepatitis and the analysis of the genetic diversity of hepatitis B and C viruses among the population of Khabarovsk city

Valeriya O. Kotova[1]✉, Elena A. Bazykina[1], Lyudmila A. Balakhontseva[1], Olga E. Trotsenko[1], Anna V. Kuznetsova[2]

[1]Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia;
[2]Center for Prevention and Combat Against AIDS and Infectious Diseases, Khabarovsk, Russia

Abstract

Introduction. Evaluation of hepatitis virus genotypes diversity plays a significant role in analysis of epidemiological situation in particular territories which allows to trace possible routs of transmission, emergence and spread of new viral variants.

The aim of the study is to evaluate dynamic of incidence of chronic forms of viral hepatitis B and C in the Khabarovsk krai during 2013-2023 and to perform analysis of genetic diversity of hepatitis B and C viruses (HBV and HCV) that were circulating in the Khabarovsk city.

Materials and methods. A retrospective analysis of the incidence of chronic forms of hepatitis C in the Khabarovsk krai was conducted for the period from 2013 to 2023 (11 years) according to reports from the Office of Rospotrebnadzor in the Khabarovsk krai. Serological and molecular-genetic analysis of 112 blood plasma samples obtained from patients with diagnosis of “chronic viral hepatitis” residing in the Khabarovsk city was conducted.

Results. The research showed that incidence of chronic viral hepatitis C has declined from 50.0 in 2013 to 44.6 cases per 100 thousand population in 2023 and incidence of chronic viral hepatitis B has also declined from 10.2 to 8.2 cases per 100 thousand population in the Khabarovsk krai respectively. HBV DNA was detected in 21 out of 36 blood plasma samples that contained serological markers of HBV. HBV genotype D was isolated in 15 out of 17 samples and was presented by two subtypes (D1, D2). Subtype A2 was identified in 2 samples. No mutations of drug resistance were found. HCV RNA was found in 58 out of 78 samples of blood plasma that were positive for antibodies (IgG + IgM) to HCV. Circulation of 1b, 1a, 3a, 2a, 2c HCV subtypes with predominance of 1b subtype was revealed in the Khabarovsk city.

Conclusion. The incidence of chronic hepatitis B and C in the Khabarovsk krai during the 11-year follow-up period had a pronounced tendency to decrease. Results of the research complement existing data on circulation of HBV and HCV genetic variants in territories of the Russian Federation.

Keywords: *Khabarovsk krai, hepatitis C virus, hepatitis B virus, genotype, subtype, chronic hepatitis, phylogenetic analysis*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 9, 1 November, 2022).

Funding source. The study was conducted as part of the industry research program of Rospotrebnadzor for the period 2021–2025 (NIOKTR No. 121052600115-4).

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

For citation: Kotova V.O., Bazykina E.A., Balakhontseva L.A., Trotsenko O.E., Kuznetsova A.V. The incidence of chronic viral hepatitis and the analysis of the genetic diversity of hepatitis B and C viruses among the population of Khabarovsk city. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):91–101.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-578
EDN: https://www.elibrary.ru/zdffei

Введение

Проблема парентеральных вирусных гепатитов В и С остаётся одной из приоритетных задач мирового здравоохранения в связи с высокой частотой развития хронических форм болезни и возможностью формирования неблагоприятных исходов в виде цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире вирусом гепатита С (HCV) поражены 50 млн человек, количество инфицированных вирусом гепатита В (HBV) составляет 254 млн

© Kotova V.O., Bazykina E.A., Balakhontseva L.A., Trotsenko O.E., Kuznetsova A.V., 2025

человек[1]. В апреле 2016 г. на Ассамблее ВОЗ было принято решение о глобальной ликвидации вирусных гепатитов как проблемы общественного здравоохранения к 2030 г.[2]

Реализация национального проекта «Здоровье» по вакцинопрофилактике гепатита В в России способствовала снижению заболеваемости острыми формами инфекции. За последние 10 лет (с 2014 по 2023 г.) заболеваемость острым гепатитом В снизилась в 4 раза — с 1,32 до 0,33 случая на 100 тыс. населения. С 2014 г. в России отмечается ежегодное снижение заболеваемости острым гепатитом С. В 2023 г. она составила 1393 больных, или 0,95 случая на 100 тыс. населения, что ниже среднемирового показателя на 27,5%, но при этом в сравнении с 2022 г. заболеваемость увеличилась на 26%. Наряду со снижением заболеваемости острыми формами гепатитов В и С на территории России продолжают регистрироваться высокие уровни новых случаев хронических форм вирусных гепатитов (ХВГ). Всего в 2023 г. зарегистрировано более 58,9 тыс. случаев ХВГ (в 2022 г. — 43,3 тыс. случаев). Показатели заболеваемости ХВГ резко отличаются по субъектам РФ (от 0,9 до 127,86 случая на 100 тыс. населения), что во многом зависит от качества проводимой диагностики и полноты регистрации данной группы заболеваний[3]. Подобная тенденция прослеживается и на территории Хабаровского края, входящего в состав Дальневосточного федерального округа[4].

В последнее время большое внимание уделяется изучению генотипической вариабельности вирусов гепатитов. Заболевания, вызванные различными генотипами, могут значительно отличаться по клиническому течению и исходам [1–3].

В настоящее время идентифицированы 10 генотипов вируса гепатита В (HBV) (обозначаются буквами от A до J). Генотипы A–D, F, H и I делят на 35 субгенотипов (для остальных генотипов субтипы не установлены) [4, 5]. Генотипы отличаются длиной генома, размером открытого для чтения региона и трансляцией белка, а также развивающимися под влиянием терапии мутациями [6, 7]. Изоляты вируса гепатита С (HCV) подразделяют на 8 генотипов [8] и 93 подтверждённых субтипа. Современная классификация HCV включает 9 межгенотипных рекомбинантных форм[5]. Для каждого генотипа характерны определённая частота встречаемости и географическая зона распространения.

По результатам молекулярно-генетических исследований, проводимых в разные годы в России, установлено, что на территории страны циркулируют 3 генотипа HBV — D, A и C с доминированием генотипа D и 4 субтипа HCV — 1a, 1b, 2 и 3a, из которых субтипы 1b и 3a являются преобладающими [9–12].

Изучение генотипического разнообразия вирусных гепатитов имеет большое значение при проведении анализа эпидемиологической обстановки на каждой конкретной территории, позволяя отслеживать возможные пути передачи инфекции, появление и распространение новых вариантов вирусов, идентифицировать завозные случаи инфекции. Всё это является важным аспектом при своевременном планировании необходимых санитарно-эпидемиологических мероприятий.

Современные молекулярно-биологические методы исследования позволяют не только проводить оценку генетического разнообразия HBV и HCV на отдельных территориях, но и определять характер клинически значимых мутаций в *P*-гене ДНК HBV и регионах NS3/NS5A/NS5B HCV, ассоциированных с возможной резистентностью к терапии препаратами прямого противовирусного действия.

Цель исследования — оценить динамику заболеваемости ХГВ и ХГС за 2013–2023 гг., провести анализ генетического разнообразия HBV и HCV, циркулирующих среди пациентов Хабаровска с диагнозом «хронический вирусный гепатит».

Материалы и методы

Ретроспективный анализ заболеваемости ХГС и ХГВ проводили с использованием данных, предоставленных Управлением Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, за период с 2013 по 2023 г. (11 лет). Значения заболеваемости ХВГ в России взяты из Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 г.».

Среднемноголетний темп прироста (T_{CP}) рассчитывали с использованием метода наименьших квадратов, доверительный интервал — методом углового преобразования Фишера. Полученную тенденцию расценивали:

- как стабильную при $T_{CP} = \pm 1\%$;

[1] World Health Organization. Hepatitis B, Fact Sheet. URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b (дата обращения: 07.05.2024); World Health Organization. Hepatitis C, Fact Sheet. URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c (дата обращения: 07.05.2024).

[2] World Health Organization. Sixty-ninth world health assembly provisional agenda item 15.1. Draft global health sector strategies. Viral hepatitis, 2016–2021. URL: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_32-en.pdf?ua=1 (дата обращения: 07.05.2024).

[3] Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году». М.; 2023. URL: https://clck.ru/3FcJ5X

[4] Доклад Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Хабаровскому краю «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Хабаровском крае в 2022 году». URL: https://clck.ru/3FcHrj

[5] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2022 URL: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification (дата обращения: 15.05.2024).

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-578

- слабо выраженную — при T_{CP} = ± 1,1–3,0%;
- умеренную — при T_{CP} = ± 3,1–5,0%;
- выраженную — при T_{CP} = ± 5,1–7,0%;
- ярко выраженную — при T_{CP} = ± 7% и выше [13].

С целью изучения генетического разнообразия HBV и HCV, циркулирующих среди населения Хабаровского края, исследованы образцы плазмы крови 112 пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит», собранные на базе Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (n = 50) и лаборатории Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии (n = 62) в 2022–2023 гг. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии (протокол № 9 от 01.11.2022). Наличие маркеров вирусных гепатитов В и С определяли методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест».

Нуклеиновые кислоты выделяли из 100 мкл плазмы крови с использованием комплекта реагента «АмплиПрайм РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Анализ на выявление ДНК HBV, РНК HCV, определение вирусной нагрузки в положительных пробах и генотипа HCV проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с применением коммерческих наборов: «АмплиСенс HBV-FL», «АмплиСенс HBV-Монитор-Fl», «АмплиСенс HCV-FL», «АмплиСенс HCV-Монитор-Fl», «АмплиСенс HCV-1/2/3» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) на приборе «Rotor Gene Q» («Qiagen»).

Для генотипирования HBV и HCV использовали метод двухступенчатой ПЦР со специфическими праймерами («Синтол») к консервативному участку перекрывающихся генов *S* и *P*, кодирующих поверхностный белок и ДНК-полимеразу HBV, и к NS5B-региону HCV [14, 15].

Дополнительно для пациентки с ХГС, получающей препараты прямого противовирусного действия, был проведён анализ нуклеотидной последовательности гена *NS5 HCV*, полученной по методике, описанной M. Rajhi и соавт. [16].

Фрагментное секвенирование по методу Сэнгера проводили при помощи набора реагентов «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits» («Applied Biosystems/Life Technologies») на ДНК-анализаторе «ABI3500» («Applied Biosystems/Life Technologies»).

Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе «BioEdit v. 7.1.9».

Филогенетический анализ выполняли с помощью программы «MEGA v. 7.0» путём построения филогенетических деревьев методом ближайших соседей [17]. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. Для оценки статистической достоверности филогенетических связей использовали bootstrap-анализ для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева.

В качестве референс-штаммов для проведения филогенетического анализа использовали последовательности той же области генома HBV и HCV из России и других стран мира, представленные в GenBank[6].

Для выявления мутаций лекарственной устойчивости применяли программное обеспечение geno2pheno[7].

В международную базу GenBank депонированы 14 полученных и проанализированных нуклеотидных последовательностей участков геномов HBV (№ PP100729–PP100742) и 44 участков геномов HCV (№ PP111728–PP111748, PP100743–PP100765). На российской платформе агрегации информации о геномах вирусов VGARus зарегистрированы 10 последовательностей участка генома HBV и 35 последовательностей участка генома HCV.

Результаты

Проведённые исследования показали, что заболеваемость ХГС в Хабаровском крае с 2013 по 2023 г. снизилась с 50,0 (95% ДИ 46,2–54,0) до 44,6 (95% ДИ 41,0–48,3) случая на 100 тыс. населения и имела выраженную тенденцию убыли (T_{CP} = –6,5%). Более значительные изменения регистрировались в Хабаровском крае в отношении заболеваемости ХГВ, которая имела ярко выраженную тенденцию убыли (T_{CP} = –11,6%), снизившись более чем в 2 раза — с 10,2 (95% ДИ 8,5–12,0) случая на 100 тыс. населения в 2013 г. до 4,5 (95% ДИ 3,4–5,7) случая на 100 тыс. населения в 2021 г.

В Хабаровске заболеваемость как ХГС, так и ХГВ на протяжении всего периода наблюдения была выше, чем в Хабаровском крае: в 2023 г. для ХГС — 56,7 (95% ДИ 50,9–62,8) случая на 100 тыс. населения (на 27,1% выше, чем в Хабаровском крае), для ХГВ — 13,3 (95% ДИ 10,6–16,3) случая на 100 тыс. населения (на 62,2% выше, чем в Хабаровском крае). В многолетней динамике заболеваемость ХГС и ХГВ в Хабаровске имела более выраженную, в сравнении с краевой, тенденцию убыли (T_{CP} = –11,6% — для заболеваемости ХГС и T_{CP} = –12,2% — для заболеваемости ХГВ) (**рис. 1**).

Снижение заболеваемости ХВГ после 2019 г. совпало с началом пандемии COVID-19, во время

[6] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
[7] URL: http://hbv.geno2pheno.org/index.php

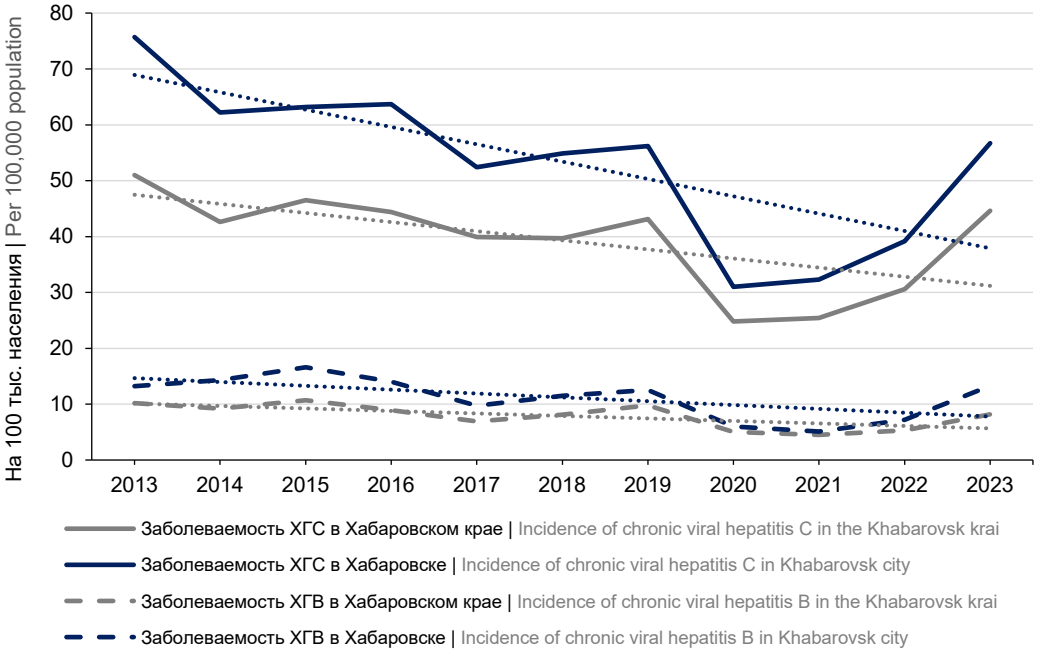


Рис. 1. Многолетняя заболеваемость ХГС и ХГВ в Хабаровском крае и Хабаровске.
Fig. 1. Long-term incidence of chronic viral hepatitis C and B in the Khabarovsk krai and Khabarovsk city.

которой вводились ограничительные мероприятия с целью снижения распространения SARS-CoV-2 среди населения. В 2022 и 2023 гг., когда ограничения были постепенно сняты, стал фиксироваться рост заболеваемости ХГС на 20,5 и 45,7% в Хабаровском крае и на 21,4 и 44,6% в Хабаровске соответственно. Заболеваемость ХГВ в Хабаровском крае и Хабаровске в 2022 г. увеличилась на 17,8 и 41,2% соответственно, а в 2023 г. — на 54,7 и 84,7%, что, вероятно, связано с увеличением числа обращений пациентов в медицинские организации, в том числе для проведения лабораторных исследований, достигнув уровня 2019 г.

Серологический и молекулярно-генетический анализ проведен для 112 образцов плазмы крови жителей Хабаровска с диагнозом «хронический вирусный гепатит». Возраст обследованных пациентов составил в среднем 51 год. Среди обследованных были 51 женщина (45,5%; 95% ДИ 36,9–55,2%) и 61 мужчина (54,5%; 95% ДИ 45,8–64,1%).

В результате проведённого исследования HBsAg был обнаружен в 36 из 112 образцов плазмы крови (32,1%; 95% ДИ 23,7–40,9%). Антитела к HCV обнаружены в 78 образцах (69,6%; 95% ДИ 61,2–78,1%). Микст-инфекцию ХГВ + ХГС имели 2 (1,8%; 95% ДИ 0,2–5,4%) пациента.

ДНК HBV выявлена в 21 (58,3%; 95% ДИ 41,7–73,4%) из 36 образцов плазмы крови пациентов с выявленными маркерами ХГВ. Во всех ДНК-положительных пробах был определён уровень вирусной нагрузки. У 19 (90,5%; 95% ДИ 74,0–98,8%) пациентов он был низкий (менее 10^4 МЕ/мл), у 2 (9,5%; 95% ДИ 1,2–26,0%) — средний (10^4–10^6 МЕ/мл).

При обследовании 78 пациентов из Хабаровска с положительным результатом иммуноферментного анализа на наличие антител (IgG + IgM) к HCV РНК вируса выявлена в 54 (69,2%; 95% ДИ 42,9–64,9%) образцах плазмы крови. Во всех РНК-положительных пробах определён уровень вирусной нагрузки. У 39 (72,2%; 95% ДИ 59,4–83,1%) пациентов он был низкий (менее 8×10^5 МЕ/мл), у 15 (27,8%; 95% ДИ 16,9–40,6%) — высокий (более 8×10^5 МЕ/мл). Предварительное генотипирование HCV, проведённое с использованием набора «АмплиСенс HCV-1/2/3», показало, что на территории Хабаровска среди обследованных пациентов наиболее распространён генотип 1 HCV, выявленный у 31 больного (57,4%; 95% ДИ 43,7–69,8%). Генотип 3 HCV обнаружен у 14 пациентов (25,9%; 95% ДИ 15,3–38,4%). В 8 случаях (14,8%; 95% ДИ 6,8–25,6%) выявлен генотип 2, у 1 пациента (1,9%; 95% ДИ 0,1–7,2%) генотип определить не удалось.

Для определения генотипа, выяснения происхождения и возможного родства вариантов HBV и HCV с изолятами из других регионов России и стран ближнего и дальнего зарубежья получены 17 нуклеотидных последовательностей участка генома HBV и 53 — участка NS5B HCV удовлетворительного качества, пригодные для проведения дальнейшего анализа.

В результате молекулярно-генетического анализа HBV у 15 пациентов (88,2%; 95% ДИ 68,9–98,7%) определён генотип D, у 2 — генотип A

(11,8%; 95% ДИ 1,3–31,1%). Филогенетические отношения между исследованными образцами и референсными последовательностями представлены на **рис. 2**.

На филограмме штаммы HBV генотипа D, полученные нами, и нуклеотидные последовательности штаммов, взятые из GenBank, разделились на две отдельные монофилетические группы, различающиеся по субтипам: D1 и D2, которые были определены в 7 (46,7%) и 8 (53,3%) образцах соответственно.

Полученные нуклеотидные последовательности (№ 442, 507, 90) сгруппировались с генетически

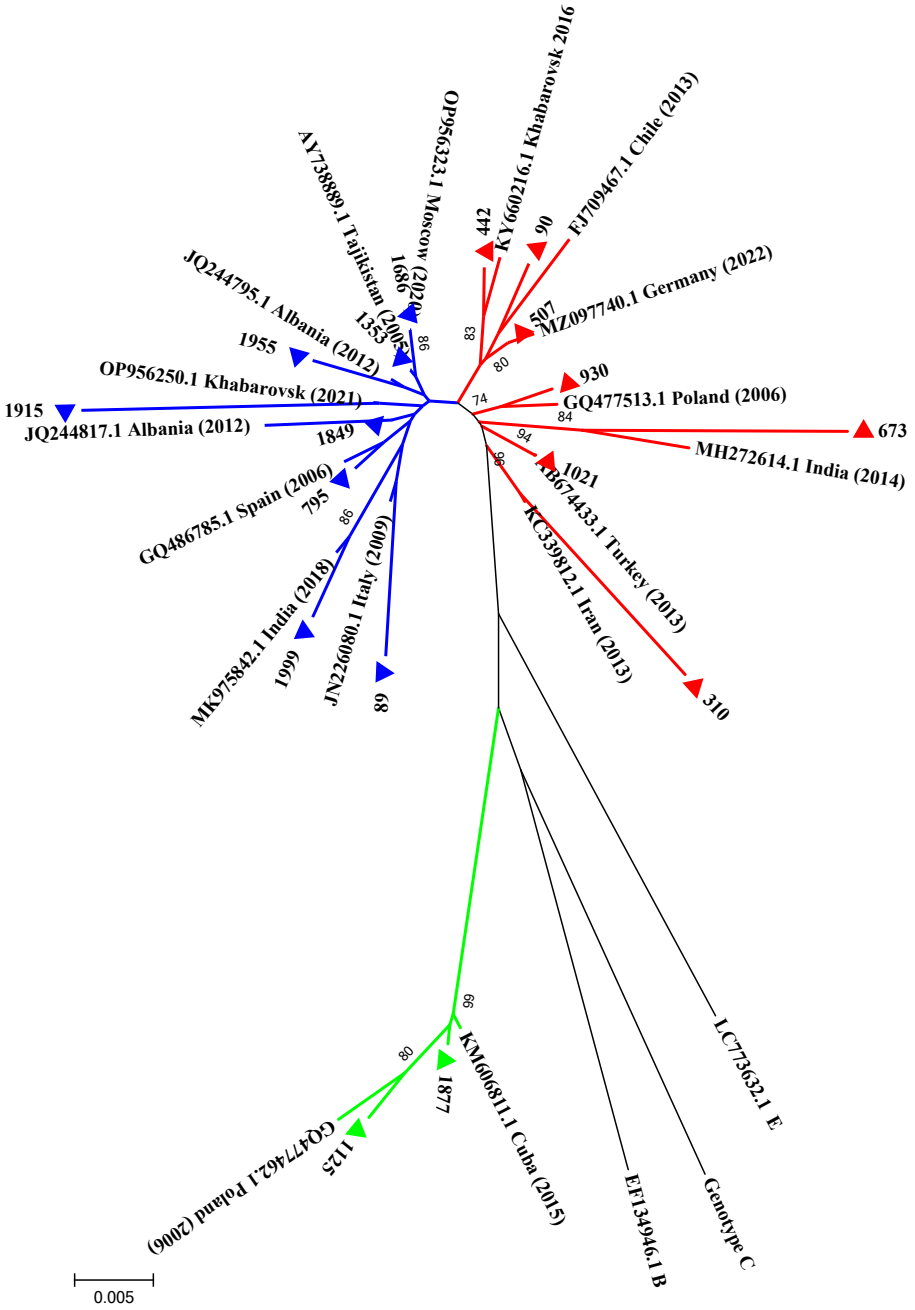


Рис. 2. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента генома HBV, циркулирующего среди населения Хабаровска.

Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей. Последовательности HBV, изученные в данной работе, выделены треугольниками. Референс-последовательности HBV обозначены номерами GenBank. Указаны значения bootstrap-индекса, превышающие 70%. Синие линии — субтип D2; красные — субтип D1; зелёные — субтип A2.

Fig. 2. Results of phylogenetic analysis of partial genomic nucleotide sequences of HBV circulating among population of the Khabarovsk city.

Phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. HBV sequences evaluated in current work are marked with triangles. HBV reference sequences are specified by their GenBank accession numbers. Bootstrap index values exceeding 70% are indicated. Blue lines — sub-genotype D2; red lines — sub-genotype D1; green lines — sub-genotype A2.

близкими последовательностями субтипа D1 из Чили (FJ709467.1), Германии (MZ0977440.1), а также со штаммом (KY660216.1), который уже был зафиксирован на территории Хабаровского края в 2016 г. Четыре образца (№ 930, 673, 1021, 310) образовали отдельные клады со штаммами субтипа D1 из Польши (GQ477513.1), Индии (MH272614.1), Турции (AB674433.1) и Ирана (KC339812.1).

Полученные нуклеотидные последовательности субтипа D2 распределились между штаммами HBV данного субгенотипа, выявленными в России (в Москве — OP956323.1 и Хабаровске — OP956250.1), и штаммами из Индии (MK975842.1), Италии (JN226080.1), Испании (GQ486785.1), Албании (JQ244817.1, JQ244795.1), Ирана (KC339865.1), Таджикистана (AY738889).

Два штамма, выделенные на территории Хабаровска (образцы № 1125, 1877), сгруппировались на филогенетическом дереве, образуя один общий кластер с референс-штаммами субтипа A2. При этом образец № 1877 обладал большим генетическим сходством с штаммом HBVсубгенотипа A2, серотипа adw2 из Кубы (KM606811.1), а образец № 1125 — со штаммом из Польши (GQ477462.1).

Нуклеотидные последовательности участка *P*-гена HBV, полученные в ходе настоящего исследования, были протестированы на наличие основных мутаций, ассоциированных с возникновением лекарственной устойчивости. Проведённый анализ показал, что все 17 штаммов HBV чувствительны к следующим противовирусным препаратам: ламивудину, адефовиру, энтекавиру, телбивудину, тенофовиру, т. е. мутаций устойчивости не обнаружено.

Филогенетические отношения между нуклеотидными последовательностями, полученными в результате прямого секвенирования NS5B области генома HCV, и референсными последовательностями отображены на **рис. 3**.

Образец № 57, для которого при предварительном генотипировании с использованием диагностической тест-системы «АмплиСенс HCV-1/2/3» не был получен результат, образовал единый кластер с изолятами, принадлежавшими субтипу 1a и выделенными в разные годы в США (KT734609.1, OK392383), где данный геновариант является эндемичным, а также в Швеции (MH510449.1), на Украине (OQ979420), в Швейцарии (EU255927.1), Нидерландах (KU563369.1), но при этом близкородственных штаммов для него не выявлено.

На филогенетическом дереве 31 из 54 исследуемых штаммов равномерно распределились между референсными последовательностями HCV субтипа 1b, представленными в международной базе данных GenBank (Греция, Франция, США, Бельгия, Испания, Тайвань, Япония, Вьетнам, Бразилия, Индонезия, Тунис). Филогенетический анализ 13 образцов, отнесённых по результатам ПЦР-генотипирования к генотипу 3, показал, что все полученные нами нуклеотидные последовательности кластеризуются на одной ветви филогенетического дерева с ранее полученными последовательностями той же области генома вариантов субтипа 3a, выделенных в разные годы в различных регионах России и мира.

Филогенетический анализ 8 образцов, отнесённых по результатам предварительного генотипирования к генотипу 2, выявил формирование 2 кластеров. Один образец (№ 81) с высоким уровнем bootstrap-поддержки (100%) образовал единый кластер с изолятами, принадлежавшими субтипу 2c, но при этом близкородственных штаммов для него не выявлено. Семь штаммов сгруппировались на филогенетическом дереве, образуя один общий кластер с изолятами HCV субтипа 2a, зарегистрированными в GenBank, которые были выделены на территории России — в Новосибирской области в 2002 г. (GQ388000.1), Республике Саха (Якутия) (KT 378626.1) в 2014 г., Ленинградской области (AF388438.1) в 2014 г., а также во Франции (MG453401.1) в 2014 г.

Для образца № 76 от пациентки с ХГС, получающей препараты прямого противовирусного действия, дополнительно был проведён анализ нуклеотидной последовательности гена *NS5AHCV* на наличие мутаций, ассоциированных с возникновением лекарственной устойчивости. В результате исследования была выявлена мутация *Y93H*, обусловливающая резистентность вируса к следующим препаратам: Daclatasvir, который входил в схему лечения пациентки, а также к Elbasvir, Ledipasvir, Ombitasvir, Velpatasvir. При анализе нуклеотидной последовательности региона *NS5B* мутаций лекарственной устойчивости в данном образце не обнаружено.

Обсуждение

Современная эпидемиологическая ситуация по вирусному гепатиту как в Хабаровском крае, так и в среднем по России характеризуется увеличением среди населения общего числа больных с хроническими формами. В целом по Хабаровскому краю за 2013–2023 г. кривые заболеваемости населения ХГС и ХГВ имели однонаправленные тенденции к снижению[8]. Несмотря на это, уровень заболеваемости ХГС в Хабаровском крае, достигший 44,6 случая на 100 тыс. населения в 2023 г., превысил среднероссийский, составлявший 31,6 случая на 100 тыс. населения. В то же время показатель заболеваемо-

[8] Доклад Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Хабаровскому краю «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Хабаровском крае в 2022 году». URL: https://clck.ru/3FcHrj

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-578
ORIGINAL RESEARCHES

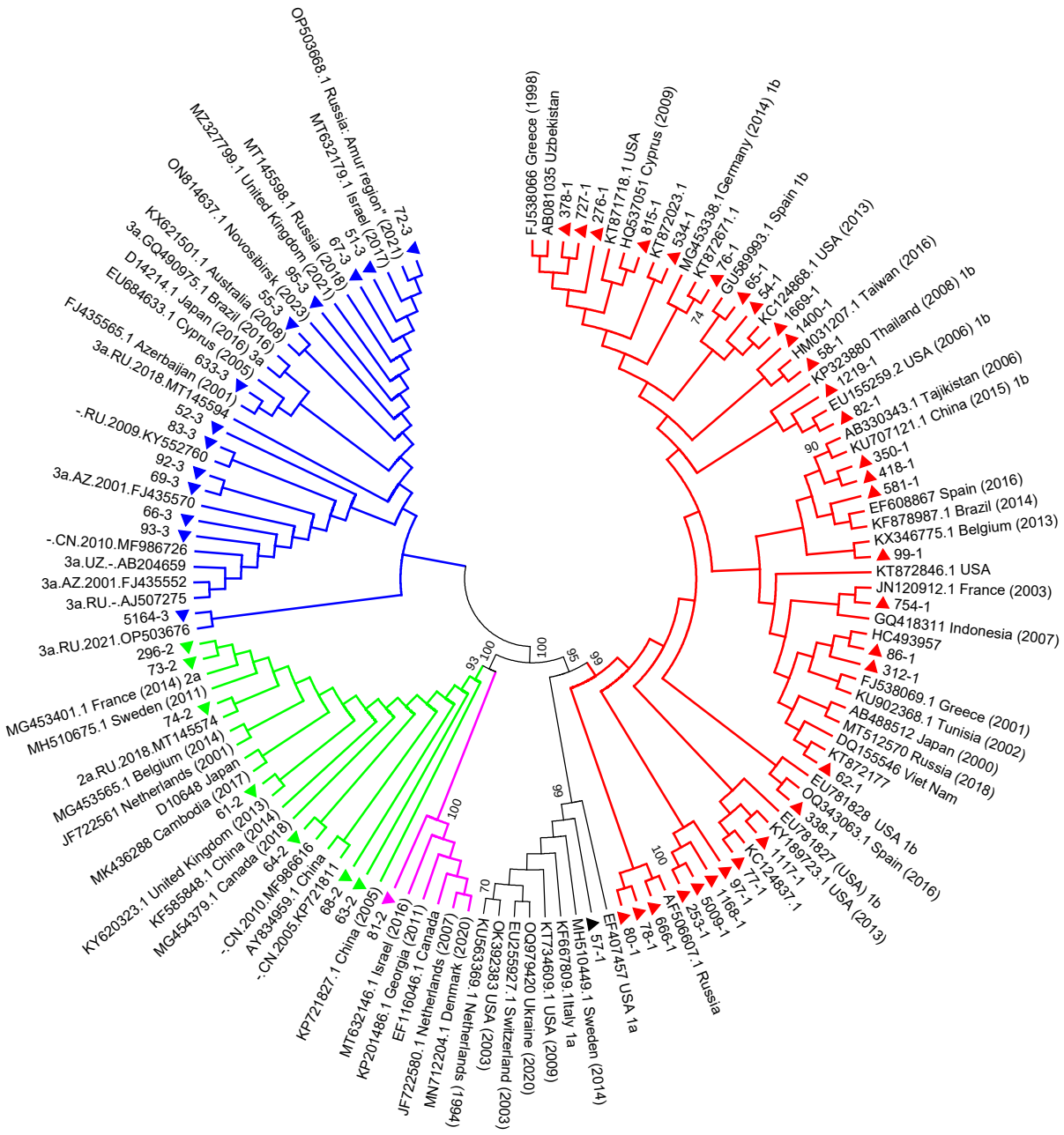


Рис. 3. Результат филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей области NS5B генома HCV, циркулирующего среди населения Хабаровска.

Филогенетическое дерево построено с помощью метода ближайших соседей. Последовательности HBV, изученные в данной работе, выделены треугольниками. Референс-последовательности HBV обозначены номерами GenBank.
Указаны значения bootstrap-индекса, превышающие 70%. Синие линии — субтип 3a; красные — субтип 1b; зелёные — субтип 2a; чёрные — субтип 1a; сиреневые — субтип 2c.

Fig. 3. Result of phylogenetic analysis of NS5B region nucleotide sequences of HCV circulating among population of the Khabarovsk city.

Phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. HCV sequences evaluated in current work are marked with triangles. HCV reference sequences are specified by their GenBank accession numbers. Bootstrap index values exceeding 70% are indicated. Blue lines — subtype 3a; red lines — subtype 1b; green lines — subtype 2a; black lines — subtype 1a; violet lines — subtype 2c.

сти населения Хабаровского края ХГВ оказался несколько ниже среднероссийского уровня — 8,2 и 8,4 случая на 100 тыс. населения соответственно.

Следует отметить, что резкое снижение заболеваемости ХГС и ХГВ, зафиксированное в 2020 г., в том числе для ХГС — в 1,7 раза с 43,0 (95% ДИ 39,5–46,6) до 24,8 (95% ДИ 22,2–27,8) и для ХГВ — почти в 2 раза с 9,8 (95% ДИ 8,2–11,6) до 5,0 (95% ДИ 3,8–6,3) случая на 100 тыс. населения, отчасти объясняется уменьшением обращаемости населения за медицинской помощью в период пандемии COVID-19.

На протяжении многих лет значительный вклад в развитие эпидемического процесса ХВГ в регионе оказывает наиболее крупный населённый пункт — г. Хабаровск, являющийся столицей края, где в 2023 г. проживало 61,1% (95% ДИ 57,1–65,1%) пациентов с ХГС и 78,1% (95% ДИ 69,7–85,4%) пациентов с ХГВ от всех случаев с впервые выявленной инфекцией в субъекте. Более высокую заболеваемость ХГС в краевой столице отчасти можно связать с большей доступностью лабораторного освидетельствования, в отличие от удалённых от краевого центра северо-восточных территорий, где регистрация заболеваемости ХВГ отсутствует либо является спорадической, например, в районе Полины Осипенко, Николаевском, Охотском, Тугуро-Чумиканском и Аяно-Майском районах.

В ходе молекулярно-генетического исследования установлены генотипы и субгенотипы HBV и HCV, циркулирующие среди больных хроническими формами инфекции в Хабаровске.

Результаты филогенетического анализа субтипов D1 и D2 из Хабаровска и базы данных GenBank показали формирование нескольких кластеров, что может свидетельствовать о разном происхождении и независимом распространении штаммов HBV, циркулирующих на исследуемой территории. Низкое сходство изученных нами штаммов со штаммами из России, возможно, обусловлено невысокой долей российских вариантов вируса, представленных в международной базе данных GenBank.

В ходе исследования были выявлены некоторые различия в распространении генетических вариантов HBV и HCV, отмеченных в данной работе среди жителей Хабаровска, и исследовании, проведённом нами в 2017–2018 гг. среди коренного населения Нанайского района Хабаровского края [18, 19]. Так, анализ частоты встречаемости подгенотипов D1, D2 и D3 HBV показал, что среди пациентов сельского района незначительно преобладал субгенотип D3 (51,3%; 95% ДИ 35,8–66,7%), а субгенотипы D2 и D1 были определены в 46,1% (95% ДИ 30,9–61,7%) и 2,6% случаях, соответственно. Необходимо отметить, что в настоящем исследовании среди городских пациентов не было выявлено ни одного случая инфицирования субгенотипом D3, что опровергает результаты описанных ранее исследований, согласно которым частота встречаемости субгенотипа D1 убывает с 45% в европейской части России до 12% в Дальневосточном регионе [20]. Отчасти это можно объяснить небольшой выборкой исследуемых образцов. Данный факт требует дальнейшего изучения.

Результаты настоящего исследования показали, что на территории Хабаровска среди обследованных пациентов наиболее распространён субвариант 1b HCV, выявленный по результатам филогенетического анализа в 58,5% случаев, в то время как на территории Нанайского района Хабаровского края зафиксировано преобладание субтипа 3a (45,0%).

Филогенетический анализ, проведённый по NS5B-региону HCV 53 исследованных образцов крови жителей Хабаровска, первоначально протипированных в ПЦР, представил следующее соотношение субтипов: 1в — 31 (58,5%; 95% ДИ 45,2–71,4%), 3а — 13 (24,5%; 95% ДИ 14,0–37,0%), 2а — 7 (13,2%; ДИ 5,5–23,5%), в единичных случаях выявлены субтипы 1a и 2c (1,9%). По итогам филогенетического анализа изолят № 57, нетипируемый обычным методом ПЦР, удалось отнести к субтипу1a.

В целом полученные данные о циркуляции геновариантов HBV и HCV среди жителей Хабаровска согласуются с данными других исследователей о доминировании на территории России генотипа D HBV и субтипов 1b и 3a HCV.

Следует отметить важность регулярного пополнения информации о генотипах/субтипах вирусов гепатитов, выявленных в субъектах РФ, в международной (GenBank) и российской (VGARus) базах данных. Это значительно расширит возможности для молекулярно-генетического мониторинга за циркулирующими генетическими вариантами вирусов на конкретной территории, а также для проведения анализа заболеваемости этими инфекциями в целом по России, что в конечном итоге может усилить действенность эпидемиологического надзора за вирусными гепатитами. Кроме того, благодаря использованию современных молекулярно-биологических методов диагностики и проведению филогенетического анализа, стало возможным прогнозировать развитие неблагополучных тенденций в эпидемиологической ситуации, а также подтвердить или опровергнуть наличие эпидемиологической связи между предполагаемым источником HCV или HBV и заболевшими при расследовании факта внутрисемейного инфицирования, групповых заболеваний, случаев внутрибольничного инфицирования или профессионального заражения вирусным гепатитом.

Заключение

Несмотря на снижение в Хабаровском крае случаев выявления острых форм парентеральных вирусных гепатитов, регистрация ХВГ остается на высоком уровне. Наиболее неблагоприятная ситуация с заболеваемостью ХГВ и ХГС в Хабаровском крае наблюдается в Хабаровске.

В результате изучения генетического разнообразия вирусов HBV и HCV на территории Хабаровска выявлена циркуляция двух генотипов HBV: D и A. Среди исследованных образцов генотип D HBV обнаружен в 88,2% случаев и представлен субгенотипами D1 и D2. На долю субтипа A пришлось 11,8%. Молекулярно-генетическое исследование HCV, циркулирующего на территории Хабаровска,

выявило циркуляцию субтипов 1b, 1a, 3a, 2a, 2c с преобладанием субтипа 1b.

При анализе нуклеотидных последовательностей участка гена *P* HBV основных мутаций лекарственной устойчивости к противовирусным препаратам не обнаружено.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol*. 2014;20(18): 5427–34. DOI: https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5427
2. Kmet Lunacek N., Poljak M., Meglic-Volkar J., et al. Epidemiological, virological and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in chronically infected persons in Slovenia. *Hepat. Mon.* 2017;17(3):e43838. DOI: https://doi.org/10.5812/hepatmon.43838
3. Martinez M.A., Franco S. Therapy implications of hepatitis C virus genetic diversity. *Viruses*. 2020;13(1):41. DOI: https://doi.org/10.3390/v13010041
4. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*. 2014;57(3-4):141–50. DOI: https://doi.org/10.1159/000360947
5. Lin C.L., Kao J.H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2015;5(5):a021436. DOI: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021436
6. Kramvis A., Kew M., François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;23(19):2409–23. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.045
7. Kramvis A., Kew M.C. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J. Viral. Hepat*. 2005;12(5):456–64. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00624.x
8. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect Dis*. 2018;218(11):1722–9. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401
9. Герасимова В.В., Левакова И.А., Бичурина М.А., Максимова Н.Р. Молекулярно-эпидемиологические особенности вирусного гепатита В. *Инфекция и иммунитет*. 2015;5(4):297–302. Gerasimova V.V., Levakova I.A., Bichurina M.A., Maksimova N.R. Molecular-epidemiological features of hepatitis B virus. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2015;5(4):297–302. EDN: https://elibrary.ru/vizekb
10. Кашникова А.Д., Быстрова Т.Н., Полянина А.В., Залесских А.А. Молекулярно-генетический мониторинг как компонент эпидемиологического надзора за гепатитом С. *Здоровье населения и среда обитания — ЗНиСО.* 2022;30(11):76–81. Kashnikova A.D., Bystrova T.N., Polyanina A.V., Zalesskikh A.A. Genetic monitoring as a component of hepatitis C surveillance. *Public Health and Life Environment — PH&LE.* 2022;30(11):76–81. DOI: https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-11-76-81 EDN: https://elibrary.ru/kmaums
11. Хорькова Е.В., Лялина Л.В., Микаилова О.М. и др. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за хроническими вирусными гепатитами В, С, D и гепатоцеллюлярной карциномой на региональном уровне. *Здоровье населения и среда обитания — ЗНиСО*. 2021;29(8):76–84. Khorkova E.V., Lyalina L.V., Mikailova O.M., et al. Current issues of epidemiological surveillance of chronic viral hepatitis B, C, D and hepatocellular carcinoma at the regional level. *Public Health and Life Environment — PH&LE.* 2021;29(8):76–84. DOI: https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-29-8-76-84 EDN: https://elibrary.ru/mhcuqj
12. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В. и др. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации. *Журнал инфектологии.* 2017;9(2):56–64. Soboleva N.V., Karlsen A.A., Kozhanova T.V., et al. The prevalence of the hepatitis c virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation. *Journal Infectology.* 2017;9(2):56–64. DOI: https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64 EDN: https://elibrary.ru/yskwxr
13. Колпаков С.Л. *Методология изучения эпидемического процесса статистическими и аналитическими методами*. Владивосток;2023. Kolpakov S.L. *Methodology of Epidemic Process Evaluation Using Statistical and Analytical Methods*. Vladivostok;2023. EDN: https://elibrary.ru/fvbtsb
14. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. *Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов*. М.;2013. Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. *Molecular Biological Basis of Viral Hepatitis Control*. Moscow;2013. EDN: https://elibrary.ru/duejiv
15. Rajhi M., Ghedira K., Chouikha A., et al. Phylogenetic analysis and epidemic history of hepatitis C virus genotype 2 in Tunisia, North Africa. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153761. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153761
16. Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В. и др. Лекарственно-резистентные варианты ВГС субтипа 1в, циркулирующие на территории Российской Федерации: анализ аминокислотных мутаций в белках NS5A и Core. *Журнал инфектологии*. 2018;10(4):30–6. Kichatova V.S., Karlsen A.A., Isaeva O.V., et al. Drug resistant variants of hepatitis c virus genotype 1B in Russia: analysis of amino acid substitutions in NS5A and core proteins. *Journal Infectology.* 2018;10(4):30–6. DOI: https://doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-4-30-36 EDN: https://elibrary.ru/vvmeki
17. Tamura K., Stecher G., Peterson D., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. 2013; 30(12):2725–9. DOI: https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
18. Котова В.О., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А. и др. Молекулярно-генетическая характеристика хронического вирусного гепатита В среди пациентов Нанайского района Хабаровского края. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2018;(35):15–21. Kotova V.O., Bakakhontseva L.A., Bazykina E.A., et al. Molecular-genetic characteristics of chronic viral hepatitis B in patients of the Nanaysky district of the Khabarovsk region. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology.* 2018;(35):15–21. EDN: https://elibrary.ru/yqxrwp
19. Котова В.О., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А. и др. Генетическое разнообразие вируса гепатита С среди населения Нанайского района Хабаровского края. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(1):148–56. Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Bazykina E.A., et al. Genetic diversity of hepatitis c virus in Nanaian region, Khabarovsk territory. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2021;11(1):148–56. DOI: https://doi.org/10.15789/2220-7619-GDO-1265 EDN: https://elibrary.ru/enfery
20. Чуланов В.П., Неверов А.Д., Карандашова И.В. и др. Молекулярно-генетические исследования в эпидемиологии вирусных гепатитов: достижения и перспективы. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014;(2):28–34. Chulanov V.P., Neverov A.D., Karandashova I.V., et al. Molecular genetic studies in the epidemiology of viral hepatitis: progress and prospects. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items.* 2014;(2):28–34. EDN: https://elibrary.ru/rzaabv

Информация об авторах

Котова Валерия Олеговна✉ — с. н. с., зав. лаб. эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, kotova.valeriya@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9824-7025

Базыкина Елена Анатольевна — м. н. с. лаб. эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, alyonaf@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-5695-6752

Балахонцева Людмила Анатольевна — руководитель Дальневосточного окружного Центра по профилактике и борьбе со СПИД Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, adm@hniiem.ru, https://orcid.org/0000-0002-3209-7623

Троценко Ольга Евгеньевна — д-р мед. наук, директор Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии, Хабаровск, Россия, trotsenko_oe@hniiem.ru, https://orcid.org/0000-0003-3050-4472

Кузнецова Анна Валерьевна — канд. мед. наук, главный врач Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Хабаровск, Россия, cpbsiz.khv@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3729-4092

Вклад авторов: *Котова В.О.* — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, проведение лабораторных исследований, написание статьи; *Базыкина Е.А.* — сбор и обработка материала, проведение лабораторных исследований, статистическая обработка, написание статьи; *Балахонцева Л.А.* — сбор и обработка материала, проведение лабораторных исследований, научное редактирование; *Троценко О.Е.*, *Кузнецова А.В.* — научное 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 21.08.2024;
принята к публикации 04.11.2024;
опубликована 30.01.2025

Information about the authors

Valeriya O. Kotova✉ — senior researcher, Head, Laboratory of epidemiology and prevention of viral hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, kotova.valeriya@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9824-7025

*Elena A. Bazykin*a — junior researcher, Laboratory of epidemiology and prevention of viral hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, alyonaf@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-5695-6752

Lyudmila A. Balakhontseva — Head, Far Eastern District center for the prevention and control of AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, adm@hniiem.ru, https://orcid.org/0000-0002-3209-7623

Olga E. Trotsenko — D. Sci. (Med.), Director, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia, trotsenko_oe@hniiem.ru, https://orcid.org/0000-0003-3050-4472

Anna V. Kuznetsova — Cand. Sci. (Med.), Chief doctor, Center for Prevention and Combat Against AIDS and Infectious Diseases, Khabarovsk, Russia, cpbsiz.khv@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3729-4092

Authors' contribution: *Kotova V.O.* — research concept and design, collection and processing of material, laboratory research, editing; *Bazykina E.A.* — collection and processing of material, laboratory research, statistical processing, editing; *Balakhontseva L.A.* — collection and processing of material, laboratory research, editing; *Trotsenko O.E.* — editing; *Kuznetsova A.V.* — 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 21.08.2024;
accepted for publication 04.11.2024;
published 30.01.2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-540
ORIGINAL RESEARCHES

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-540

Очаги иерсиниозов Крымского полуострова

Беднарская Е.В.✉, Дмитренко Н.Б., Беркович Н.А., Проскурнин Р.В.

Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе, Симферополь, Россия

Аннотация

Введение. Значительный рост заболеваемости, высокий уровень инфицированности мелких млекопитающих в ряде районов определили осложнение эпидемиологической ситуации по иерсиниозу.

Цель работы — определение фактических границ природных и антропургических очагов иерсиниозов на Крымском полуострове.

Материалы и методы. Обследован 21 административный район Крымского полуострова. Доставленный материал исследовали по утверждённым методикам.

Результаты. В 2022 г. из 1005 отловленных мелких млекопитающих 31 особь была положительной на кишечный иерсиниоз, 3 — на псевдотуберкулёз. Штамм *Yersinia enterocolitica* O3 выделен из 28 проб 6 видов с территории 5 районов степного Крыма, Керченского полуострова, предгорий главной гряды; штамм *Y. enterocolitica* O9 — из 3 проб 2 видов с территории 2 районов степного Крыма; *Y. pseudotuberculosis* — из 3 проб 2 видов с территории 2 районов степного Крыма. В 2023 г. из 857 мелких млекопитающих 80 проб были положительны на кишечный иерсиниоз, 2 — на псевдотуберкулёз. *Y. enterocolitica* O3 выделена из 79 проб 8 видов с территории 7 районов горного Крыма и предгорий главной гряды, степного Крыма, г. Севастополя, Керченского полуострова; *Y. enterocolitica* O9 — из 1 пробы 1 вида с территории 1 района Керченского полуострова; *Y. pseudotuberculosis* — из 2 проб 2 видов с территории степного Крыма и г. Севастополя.

Обсуждение. Все виды, образующие основу фаунистического комплекса мелких млекопитающих Крымского полуострова, являются резервуаром иерсиний. При этом количество положительных находок не зависит от общей численности, но прямо пропорционально индексу доминирования: степная мышь → домовая мышь → общественная полёвка.

Выводы. На территории 10 административных районов Крымского полуострова (Джанкойского, Красногвардейского, Белогорского, Бахчисарайского, Симферопольского, Кировского, Сакского, Ленинского, Первомайского районов, г. Севастополя) существуют природные очаги иерсиниоза и псевдотуберкулёза. Возбудители обнаружены у 9 видов мелких млекопитающих. На территории Севастополя, ранее считавшейся не энзоотичной по группе иерсиниозных инфекций, в 2023 г. выявлен новый антропургический очаг.

Ключевые слова: *иерсиниоз, псевдотуберкулёз, Республика Крым, Севастополь, эпизоотологический мониторинг, природные и антропургические очаги*

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 Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе (протокол № 3 от 06.05.2024).

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: Беднарская Е.В., Дмитренко Н.Б., Беркович Н.А., Проскурнин Р.В. Очаги иерсиниозов Крымского полуострова. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):102–111.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-540
EDN: https://www.elibrary.ru/xlwxgk

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-540

Foci of yersiniosis infections in the Crimean Peninsula

Elena V. Bednarskaya✉, Nataliia B. Dmitrencko, Nataliia A. Berkovich, Roman V. Proskurnin

Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the Federal City of Sevastopol, Simferopol, Russia

© Беднарская Е.В., Дмитренко Н.Б., Беркович Н.А., Проскурнин Р.В., 2025

Abstract

Introduction. A significant increase in morbidity and a high rates of infection among small mammals in a number of areas have determined a significant worsening of the epidemiological situation with yersiniosis.

Objective. To determine the actual boundaries of natural and anthropurgical yersiniosis foci in the Crimean Peninsula.

Materials and methods. 21 administrative districts of the Crimean Peninsula were surveyed. The study of collected samples was carried out according to approved methods.

Results. In 2022, out of 1005 rodents captured, 31 were positive for enteric yersiniosis, 3 were positive for pseudotuberculosis. *Yersinia enterocolitica* strain O3 was isolated from 28 samples obtained from 6 rodent species from the territory of 5 districts of the Steppe Crimea, the Kerch Peninsula, and the foothills of the Main Ridge. *Y. enterocolitica* strain O9 was isolated from 3 samples obtained from 2 rodent species from the territory of 2 districts of the Steppe Crimea. *Y. pseudotuberculosis* was isolated from 3 samples obtained from 2 rodent species from the territory of 2 districts of the Steppe Crimea. In 2023, out of 857 rodents captured, 80 samples were positive for enteric yersiniosis and 2 were positive for pseudotuberculosis. *Y. enterocolitica* strain O3 was isolated from 79 samples obtained from 8 rodent species from the territory of 7 districts of the Mountainous Crimea and the foothills of the main ridge, Steppe Crimea, Sevastopol, Kerch Peninsula. *Y. enterocolitica* strain O9 was isolated from 1 sample obtained from 1 rodent species from the territory of the 1st district of the Kerch Peninsula. *Y. pseudotuberculosis* was isolated from 2 samples obtained from 2 rodent species from the territory of 2 districts: Steppe Crimea and Sevastopol.

Discussion. All species that form the basis of the faunal complex of small mammals of the Crimean Peninsula are a reservoir of Yersinia. At the same time, the number of positive findings does not depend on the total number of rodents, but is directly proportional to the dominance index: steppe mouse → house mouse → social vole.

Conclusion. On the territory of 10 administrative districts of the Crimean Peninsula (Dzhankoysky, Krasnogvardeysky, Belogorsky, Bakhchisaraysky, Simferopolsky, Kirovsky, Saksky, Leninsky, Pervomaisky districts, as well as Sevastopol) natural foci of yersiniosis and pseudotuberculosis were identified. Pathogens have been found in rodents of 9 species. In the territory of Sevastopol that has been considered previously as non-enzootic for the group of yersiniosis infections, a new anthropurgical foci was identified in 2023.

Keywords: *yersiniosis, pseudotuberculosis, Crimean Republic, Sevastopol, epizootological monitoring, natural and anthropurgical foci*

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 Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the Federal City of Sevastopol (protocol No. 3, May 6, 2024).

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: Bednarskaya E.V., Dmitrencko N.B., Berkovich N.A., Proskurnin R.V. Foci of yersiniosis infections in the Crimean Peninsula. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):102–111.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-540
EDN: https://www.elibrary.ru/xlwxgk

Введение

Термин «иерсиниозные инфекции» чаще объединяет два инфекционных заболевания: кишечный иерсиниоз (КИ; возбудитель — *Yersinia enterocolitica*) и псевдотуберкулёз (ПТБ; возбудитель — *Y. pseudotuberculosis*) [1–3].

Иерсиниоз — сапрозоонозное инфекционное заболевание, вызываемое *Y. enterocolitica*, штаммы O3 и O9 высокопатогенны и энтеротоксичны [1]. КИ вызывает поражение желудочно-кишечного тракта, имеет полиорганные клинические проявления, токсико-аллергическую симптоматику [4–7].

Возбудители зоофильных сапронозов, ПТБ, иерсиниоза имеют обязательную сапрофитическую фазу, но характеризуются более тесными и регулярными связями с человеком или животными [8–12]. Восприимчивость животных к иерсиниям, а также возникновение эпизоотий практически во всех группах диких и сельскохозяйственных животных описаны многими авторами [13–17]. Особую роль в формировании антропургических очагов отводят птицам: голубям, серебристым чайкам [18–20].

Ряд авторов относят иерсиниоз к эмерджентным инфекциям с низкой актуальностью [21–23]. Другие же отмечают, что для эмерджентных инфекций (иерсиниоза) характерны спорадические вспышки, связанные с персистенцией возбудителя, скрытым возникновением и распространением инфицированных животных [24–26].

По сравнению с 2021 г., в 2022 г. количество выявленных случаев КИ на юге России увеличилось в 1,5 раза [27]. В Крыму в 2022 г. зарегистрированы 3 случая КИ, в Севастополе — 1. Заболеваемость ПТБ не регистрировалась. В 2023 г. на Крымском полуострове зарегистрировано 15 случаев заболевания КИ: 3 — в Республике Крым, 12 — в Севастополе), 3 случая заболевания ПТБ в Севастополе. Заболеваемость ПТБ в Крыму в 2023 г. не регистрировалась.

© Bednarskaya E.V., Dmitrencko N.B., Berkovich N.A., Proskurnin R.V., 2025

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-540

Значительный рост заболеваемости, высокий уровень инфицированности мелких млекопитающих (ММ) в ряде районов определили значительное осложнение эпидемиологической ситуации по КИ.

На Крымском полуострове существуют сапронозные природные очаги КИ и ПТБ. Возбудители *Y. enterocolitica* обнаружены у 10 видов ММ [28].

С 1982 по 1985 г. специалистами Крымской противочумной станции, исследовавшими материал от более 10 тыс. ММ, были выделены 252 штамма *Y. enterocolitica*, из которых 13 патогенны для человека [29, 30].

Впервые от больных людей на территории Крыма выделены непатогенные штаммы O5, O15, а также *Y. intermedia* [29, 30]. В 1984–2019 гг. лабораторией отдела особо опасных инфекций Крымской республиканской санитарно-эпидемиологической станции (СЭС; в настоящее время — лаборатория особо опасных инфекций Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и ГФЗ Севастополе) бактериологическими, серологическими методами исследованы более 24 тыс. ММ: 909 особей насекомоядных семейства Землеройковых (*Soricidae*) 3 видов: белозубки малая (*Crocidura suaveolens*; *n* = 1706) и белобрюхая (*Cr. leucodon*) (*n* = 153), бурозубка малая (*Sorex minutus*; *n* = 50) и 22 341 особь грызунов 8 видов отряда *Rodentia*: 5 видов семейства *Muridae* — мыши степная (*Sylvaemus witherbyi*; *n* = 8793), малая лесная (*Syl. uralensis*; *n* = 2777), жёлтогорлая (*Syl. flavicollis* Melchior, = *tauricus* Pallas; *n* = 918), домовая (*Mus musculus*; *n* = 4478) и курганчиковая (*Mus spicilegus*; *n* = 534); 2 вида семейства *Arvicolidae* — полёвки обыкновенная (алтайская) (*Microtus obscurus*; *n* = 2579) и общественная (*M. socialis*; *n* = 1825); 1 вид семейства *Cricetidae* — хомячок серый (*C. migratorius*; *n* = 437).

Возбудитель обнаружен у 4,22% особей *M. socialis*, 2,06% *Mus spicilegus*, 1,96% *Cr. leucodon*, 1,85% *Syl. flavicollis*, 1,33% *Syl. uralensis.* У остальных видов этот показатель колебался от 0,92% у *Cr. migratorius* до минимальных 0,41% у *Syl. witherbyi* [28].

Обобщённые данные по материалам многолетних, с 1985 г., эпизоотологических, бактериологических, вирусологических и серологических исследований, проводимых в Санитарно-эпидемиологическом отряде Краснознаменного Черноморского флота, республиканской СЭС, СЭС г. Севастополя, а также данные по зоонозным инфекциям на территории Крымского полуострова показали, что при исследовании более 41 тыс. млекопитающих 27 видов было выделено 816 культур *Y. enterocolytica* в ряде административных территорий Крыма: Красноперекопском, Первомайском, Судакском, Ленинском, Бахчисарайском районах, а также в Симферополе и Ялте, что свидетельствует о значительном заражении возбудителем КИ мелких грызунов, отловленных в различных ландшафтных зонах Крыма [31]. В различных местах обитаниях в циркуляции возбудителя участвуют ММ (серые крысы, домовые и степные мыши, обыкновенные полёвки) и зайцы, домашние животные — коровы, лошади, овцы [32] .

Несмотря на выраженную циркуляцию возбудителя, фактические границы очагов не определены, более того, часть авторов сообщала об их отсутствии [31, 32], другая — об отсутствии выраженных границ [33].

В связи с вышеизложенным **целью** данной работы является определение фактических границ природных и антропургических очагов КИ на Крымском полуострове с учётом данных эпизоотологического мониторинга эпидемической ситуации в 2022–2023 гг.

Материалы и методы

Учёты численности, мониторинг очагов природно-очаговых инфекций проводился в рамках ежегодного эпизоотологического мониторинга зоогруппой ЦГиЭ Роспотребнадзора.

Обследован 21 административный район Крымского полуострова, осуществлены 40 плановых экспедиционных выездов, 21 внеплановый выезд в рамках эпидемиологического расследования очагов, выставлено 14 000 ловушек[1], обследованы все ландшафтно-экологические зоны и подзоны: степная, предгорная, горная, солончаковые степи Керченского полуострова, все типы природных стаций.

Отловлено 1862 особи ММ (в 2022 г. — 1005 особей, в 2023 г. — 857). Лабораторные исследования доставленного материала проводили в лаборатории особо опасных инфекций ЦГиЭ Роспотребнадзора в РК и ГФЗ Севастополе в соответствии с действующими методическими указаниями[2]. 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 Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе (протокол № 3 от 06.05.2024).

Исследование включало три этапа:

- I этап исследования — пробоподготовка и посев нативного материала на среды накопления. Постановка ускоренного метода ис-

[1] Методические рекомендации «Отлов, учет и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекционных болезней». МР 3.1.0211-20». М.; 2020. 5 с.

[2] Методические указания «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях». МУК 4.2.3019-12. М.; 2012. 57 с. URL: https://gostrf.com/normadata/1/4293784/4293784720.pdf

следования нативного материала — полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- II этап исследования — высевы на дифференциально-диагностические среды, отсев характерных по морфологическим свойствам колоний иерсиний. Постановка ПЦР из сред накопления (2–3-и сутки «холодового обогащения»);
- III этап исследования — идентификация.

Для выявления ДНК иерсиний использованы наборы для ПЦР.

Для постановки реакции непрямой гемагглютинации использованы коммерческие эритроцитарные диагностикумы к *Y. pseudotuberculosis* I серотипа и *Y. enterocolitica* серотипов O:3 и O:9, представляющие собой полисахаридные антигены иерсиний, фиксированные на поверхности формалинизированных бараньих эритроцитов. Бактериологическими, молекулярно-генетическими, серологическими методами исследованы 1862 пробы.

Для анализа эпидемической ситуации были использованы статистические формы отчёта по заболеваемости в Республике Крым и г. Севастополе за 2022 и 2023 гг.

Результаты

В 2022 г. из 1005 отловленных ММ 31 были положительны на КИ, 3 — на ПТБ: *Y. enterocolitica* O3 выделена из 28 проб ММ 6 видов с территории 5 районов степного Крыма, Керченского полуострова, предгорий главной гряды; *Y. enterocolitica* O9 — из 3 проб ММ 2 видов с территории 2 районов степного Крыма; *Y. pseudotuberculosis* — из 3 проб ММ 2 видов с территории 2 районов степного Крыма (**табл. 1**). Исследования материала проводили бактериологическими, молекулярно-генетическими, серологическими методами, но положительные результаты получены только с использованием серологических методов исследования.

В 2023 г. из 857 отловленных ММ 80 проб были положительны на КИ, 2 — на ПТБ. *Y. enterocolitica* O3 выделена из 79 проб 8 видов ММ с территории 7 районов горного Крыма и предгорий главной гряды, степного Крыма, Севастополя, Керченского полуострова. *Y. enterocolitica* O9 выделена из 1 пробы 1 вида ММ с территории 1 района Керченского полуострова. *Y. pseudotuberculosis* выделена из 2 проб 2 видов ММ с территории 2 районов: степной Крым и Севастополь (**табл. 2**). С использованием серологических методов исследования получены 73 положительные пробы; с использованием ПЦР — 8; с использованием микробиологических методов исследования — 1 положительная проба, выделена культура.

Всего в 2022–2023 гг. получено 111 проб, положительных на КИ, с территории 9 административных районов Республики Крым и Севастополя; 5 проб, положительных на ПТБ, — с территории 3 районов. *Y. enterocolitica* и антитела к ней выявлены у следующих видов ММ: белобрюхая белозубка — 3 (2,7%); малая белозубка — 10 (9%); серый хомячок — 2 (1,8%); обыкновенный хомяк — 1 (0,9%); общественная полёвка — 26 (23,4%); домовая мышь — 21 (18,9%); курганчиковая мышь — 2 (1,8%); жёлтогорлая мышь — 11 (9,9%); степная мышь — 34 (30,6%). Таким образом, к наиболее инфицированным *Y. enterocolitica* видам можно отнести степную мышь, общественную полёвку и домовую мышь. Пять проб, положительных на *Y. pseudotuberculosis,* включали лишь два вида: домовая мышь — 3 (60%) и общественная полёвка — 2 (40%).

Обсуждение

Все виды, образующие основу фаунистического комплекса ММ Крымского полуострова, являются резервуаром иерсиний. При этом количество положительных находок не зависит от общей численности, на что указывали ранее [13, 34], но прямо пропорционально индексу доминирования. Индекс доминирования наиболее инфицированных ММ в 2023 г. составил: степная мышь — 31% (в 2022 г. — 38%); домовая мышь — 19,8% (в 2022 г. — 23,4%); общественная полёвка — 11,6% (в 2022 г. — 12,4%). Отмеченная закономерность подтверждает выраженные биоценотические связи между ММ фауны Крымского полуострова и, как следствие, перекрывание экологических ниш из-за сходных источников трофики, ограниченного пространства для проживания.

Резкое увеличение числа инфицированных особей в 2023 г. и значительное увеличение заболеваемости также связаны с климатическими особенностями указанного периода: обильные осадки, аномально тёплые осень и начало зимы привели к длительной вегетации растений, увеличению семенной продукции, значительному увеличению сроков сохранности наземных вегетативных органов растений. Это, в свою очередь, способствовало длительному поддержанию цепочки передачи возбудителя: почва → растение → ММ. Данный путь передачи подтверждён многими авторами [13, 23, 25, 26]

Описанные ранее положительные находки [28–32] территориально соответствуют результатам, полученным в 2022 и 2023 гг.

Таким образом, на протяжении 30 лет подтверждается инфицированность *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* ММ из природных стаций 8 административных районов Республики Крым: Джанкойского, Красногвардейского, Белогорского, Бахчисарайского, Симферопольского, Кировского, Сакского, Ленинского, Первомайского районов. На территории всех перечисленных административных районов регистрируется спорадическая

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-540

Таблица 1. Результаты лабораторных исследований ММ на КИ, ПТБ в 2022 г.
Table 1. Results of laboratory studies of rodent mammals for yersiniosis and pseudotuberculosis in 2022

Выявлены антитела к возбудителям Identified antibodies to pathogens	Вид ММ Small mammal species	*n*	Район Region	Населённый пункт Locality	Ландшафтная зона Landscape area
Y. enterocolitica O3	Малая белозубка *Cr. suaveolens*	1	Бахчисарайский Bahchisarajskij	Кудрино Kudrino	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	1	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Миролюбовка Mirolyubovka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Курганчиковая мышь *Mus spicilegus*	1	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Миролюбовка Mirolyubovka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	1	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Миролюбовка Mirolyubovka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	2	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Григорьевка Grigor'evka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	4	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Краснодарка Krasnodarka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	8	Ленинский Leninskij	Песочное Pesochnoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	1	Ленинский Leninskij	Песочное Pesochnoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	1	Ленинский Leninskij	Романово Romanovo	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Серый хомячок *Cr. migratorius*	1	Ленинский Leninskij	Останино Ostanino	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Серый хомячок *Cr. migratorius*	1	Джанкойский Dzhankojskij	Мартыновка Martynovka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	1 1	Джанкойский Dzhankojskij	Просторное Prostornoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	1 1	Ленинский Leninskij	Багерово Bagerovo	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Малая белозубка *Cr. suaveolens*	1 1	Ленинский Leninskij	Багерово Bagerovo	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	2 2	Сакский Sakskij	Ивановка Ivanovka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	1 1	Первомайский Pervomajskij	Ровное Rovnoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O9	Общественная полёвка *M. socialis*	1 1	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Краснодарка Krasnodarka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O9	Домовая мышь *Mus musculus*	1 1	Джанкойский Dzhankojskij	Мартыновка Martynovka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O9	Домовая мышь *Mus musculus*	1 1	Джанкойский Dzhankojskij	Просторное Prostornoe	Степная Steppe
Y. pseudotuberculosis	Общественная полёвка *M. socialis*	1 1	Сакский Sakskij	Наташино Natashino	Степная Steppe
Y. pseudotuberculosis	Домовая мышь *Mus musculus*	1 1	Джанкойский Dzhankojskij	Мартыновка Martynovka	Степная Steppe
Y. pseudotuberculosis	Домовая мышь *Mus musculus*	1 1	Джанкойский Dzhankojskij	Славянское Slavyanskoe	Степная Steppe

заболеваемость населения, в основном в сельской местности. Это позволяет считать указанные районы энзоотичными по КИ и ПТБ.

Ввиду того, что положительные находки среди ММ из природных стаций регистрируются регулярно, а спорадическая заболеваемость возникает в основном в сельской местности, очаги на территории этих районов можно считать природными.

С 1989 по 2014 г. заболеваемость регистрировалась в Симферопольском, Красногвардейском, Ленинском районах, городском округе Большая Ялта, однако, по имеющимся данным, не регистрировалась в Севастополе и прилегающих к нему административных образованиях. В 2022 г. зарегистрированы 3 случая заболевания в Симферопольском районе, 1 случай заболевания в Севастополе.

Таблица 2. Результаты лабораторных исследований ММ на КИ и ПТБ в 2023 г.
Table 2. Results of laboratory studies of rodent mammals for yersiniosis and pseudotuberculosis in 2023

Выявлены возбудители и антитела к ним Identified pathogens and antibodies to them	Вид ММ Small mammal species	*n*	Район Region	Населённый пункт Locality	Зона Landscape area
Y. enterocolitica O3	Малая белозубка *Cr. suaveolens*	1	Ленинский Leninskij	Щёлкино Shelkino	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	1	Ленинский Leninskij	Щёлкино Shelkino	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Белобрюхая белозубка *Cr. leucodon*	1	Ленинский Leninskij	Казантип Kazantip	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	1	Ленинский Leninskij	Казантип Kazantip	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	6	Ленинский Leninskij	Красногорка Krasnogorka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	2	Ленинский Leninskij	Семисотка Semisotka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	2	Ленинский Leninskij	Семисотка Semisotka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Малая белозубка *Cr. suaveolens*	5	Ленинский Leninskij	Семисотка Semisotka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Белобрюхая белозубка *Cr. leucodon*	1	Ленинский Leninskij	Семисотка Semisotka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Малая белозубка *Cr. suaveolens*	1	Ленинский Leninskij	Каменское Kamenskoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	1	Ленинский Leninskij	Каменское Kamenskoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	1	Ленинский Leninskij	Ильичево Il'ichevo	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Малая белозубка *Cr. suaveolens*	1	Ленинский Leninskij	Ильичево Il'ichevo	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	1	Ленинский Leninskij	Ильичево Il'ichevo	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	8	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Доходное Dohodnoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Желтогорлая мышь *Syl. flavicollis*	1	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Доходное Dohodnoe	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	1	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Щербаково Sherbakovo	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Желтогорлая мышь *Syl. flavicollis*	1	Севастополь Sevastopol	СНТ «Сапун-гора» SNT "Sapun-gora"	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Желтогорлая мышь *Syl. flavicollis*	1	Севастополь Sevastopol	Бельбек Bel'bek	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Желтогорлая мышь *Syl. flavicollis*	1	Симферопольский Simferopol'skij	Мирное Mirnoe	Предгорья Foothill
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	2	Симферопольский Simferopol'skij	Мирное Mirnoe	Предгорья Foothill
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	1	Советский Sovetskij	Чапаевка Chapaevka	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	5	Советский Sovetskij	Новый мир Novyj Mir	Степная Steppe
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	4	Белогорский Belogorskij	Кривцово Krivcovo	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Малая белозубка *Cr. suaveolens*	1	Белогорский Belogorskij	Кривцово Krivcovo	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Желтогорлая мышь *Syl. flavicollis*	3	Белогорский Belogorskij	Кривцово Krivcovo	Горная Mountain

Окончание табл. 2 | End of the Table 2

Выявлены возбудители и антитела к ним Identified pathogens and antibodies to them	Вид ММ Small mammal species	*n*	Район Region	Населённый пункт Locality	Зона Landscape area
Y. enterocolitica O3	Степная мышь *Syl. witherbyi*	6	Белогорский Belogorskij	Зеленогорское Zelenogorskoe	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	2	Белогорский Belogorskij	Зеленогорское Zelenogorskoe	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Курганчиковая мышь *Mus spicilegus*	1	Белогорский Belogorskij	Зеленогорское Zelenogorskoe	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Общественная полёвка *M. socialis*	2	Белогорский Belogorskij	Зеленогорское Zelenogorskoe	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	4	Кировский Kirovskij	Яркое поле Yarkoe Pole	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	4	Симферопольский Simferopol'skij	Дружное Druzhnoe	Предгорья Foothill
Y. enterocolitica O3	Домовая мышь *Mus musculus*	1	Симферопольский Simferopol'skij	Симферополь Simferopol	Предгорья Foothill
Y. enterocolitica O3	Желтогорлая мышь *Syl. flavicollis*	1	Кировский Kirovskij	Журавки Zhuravki	Предгорья Foothill
Y. enterocolitica O3	Желтогорлая мышь *Syl. flavicollis*	3	Севастополь Sevastopol	Осипенко Osipenko	Горная Mountain
Y. enterocolitica O3	Обыкновенный хомяк *Cr. cricetus*	1	Севастополь Sevastopol	Севастополь Sevastopol	Горная Mountain
Y. enterocolitica O9	Белобрюхая белозубка *Cr. leucodon*	1	Ленинский Leninskij	Семисотка Semisotka	Степная Steppe
Y. pseudotuberculosis	Общественная полёвка *M. socialis*	1	Красногвардейский Krasnogvardejskij	Доходное Dohodnoe	Степная Steppe
Y. pseudotuberculosis	Домовая мышь *Mus musculus*	1	Севастополь Sevastopol	Севастополь Sevastopol	Горная Mountain

В 2023 г. показатели по Республике Крым остались на прежнем уровне, а заболеваемость КИ в Севастополе возросла многократно. Ранее заболеваемость КИ в этом районе Крымского полуострова не отмечалась, также не было положительных находок заражённых природных и синантропных грызунов. Осложнение эпидемиологической ситуации началось в феврале 2023 г., к концу марта случаи стали регистрироваться реже, второй пик пришёлся на ноябрь–декабрь.

При этом из 12 случаев заболевания КИ и 3 случаев заболевания ПТБ только 2 зарегистрированы в сельской местности (дачные кооперативы возле с. Осипенко), остальные приходятся на черту города. Среди инфицированных грызунов преобладают домовая мышь, жёлтогорлая мышь, обыкновенный хомяк. Инфицированные животные отлавливались как непосредственно в домах, где были случаи заболевания, так и на придомовых территориях, в подвалах, на свалках, на площадках под мусорными контейнерами.

В 8 из 15 случаев не выявлено непосредственных контактов с грызунами и продуктами их жизнедеятельности — очаги не могут быть классифицированы как домашние. Также нельзя установить общий, «стартовый» источник распространения возбудителя, т. к. в Севастополе нет централизованных овощехранилищ. В этом случае обсеменение иерсиниями продуктов происходило независимо друг от друга в разных районах города. Ведущую роль в этом процессе играли антисанитарное состояние некоторых городских рынков, низкая эффективность проводимых дератизационных мероприятий.

Ни в одном из случаев первичный диагноз «иерсиниоз», «псевдотуберкулёз» выставлен не был, а его изменение происходило на 3–7-е сутки после госпитализации, что существенно затягивало сроки начала эпидемиологического расследования.

На наш взгляд, значительный рост заболеваемости населения КИ в Севастополе возник по двум группам причин. Естественные причины связаны со средним ходом температур осеннего и зимнего периодов, значительной активизацией возбудителей в природных очагах большинства административных районов Крыма, длительностью вегетации травянистой растительности, возникновением эпизоотии среди ММ. Антропогенные причины появились из-за значительного увеличения площади застройки естественных биотопов и, как следствие, увеличения контакта людей с внешней средой. Вышеизложенное — яркий пример перехода природного очага в антропургический.

Выводы

1. На территории 10 административных районов Крымского полуострова существуют природные очаги КИ и ПТБ. Циркуляция возбудителей выявлена среди ММ на территориях Джанкойского, Красногвардейского, Белогорского, Бахчисарайского, Симферопольского, Кировского, Сакского, Ленинского, Первомайского районов, а также Севастополя.

2. Возбудители обнаружены у 9 видов ММ: белобрюхая белозубка, малая белозубка, серый хомячок, обыкновенный хомяк, общественная полёвка, домовая мышь, курганчиковая мышь, жёлтогорлая мышь, степная мышь. К наиболее инфицированным *Y. enterocolitica* видам отнесены степная мышь (30,6%), общественная полёвка (23,4%), домовая мышь (18,9%). Пробы, положительные на *Y. pseudotuberculosis*, включали лишь два вида: домовая мышь — 3 (60%), общественная полёвка — 2 (40%).

3. Количество положительных находок не зависит от общей численности, а прямо пропорционально индексу доминирования.

4. В 2022–2023 гг. наблюдалось значительное ухудшение эпидемической ситуации ввиду значительной активизации возбудителя в природных очагах, количество положительных находок в 2023 г. в 3 раза больше, чем в 2022 г.

5. На территории Севастополя, ранее считавшейся не энзоотичной по группе иерсиниозных инфекций, в 2023 г. выявлен новый антропургический очаг.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Смирнов И.В. Возбудитель иерсиниоза и близкие к нему микроорганизмы. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2004;6(1):10–21. Smirnov I.V. *Yersinia enterocolitica* and related microorganisms. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;6(1):10–21
2. Антипов М.О., Бражников А.Ю., Брико Н.И. и др. *Эпидемиология*. М.;2023:75–85. Antipov M.O., Brazhnikov A.Yu., Briko N.I., et al. *Epidemiology [Epidemiologiya]*. Moscow; 2023:75–85.
DOI: https://doi.org/10.33029/9704-7227-9-EPI-2023-1-648
EDN: https://elibrary.ru/kjshke
3. Wu F., Ren F., Xie X., et al. The implication of viability and pathogenicity by truncated lipopolysaccharide in *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2023;107(23):7165–80. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-023-12785-w
4. Fredriksson-Ahomaa M. Enteropathogenic *Yersinia* spp. In: Sing A., eds. *Zoonoses: Infections Affecting Humans and Animals*. Cham;2022:1–25.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-85877-3_8-1
5. Yue Y., Zheng J., Sheng M., et al. Public health implications of *Yersinia enterocolitica* investigation: an ecological modeling and molecular epidemiology study. *Infect. Dis. Poverty*. 2023;12(1):41.
DOI: https://doi.org/10.1186/s40249-023-01063-6
6. Сорокин А.Н., Соловьев М.В., Раевский К.П. и др. Иерсиниозы: особенности течения, диагностики и лечения. *Военно-медицинский журнал*. 2023;344(3):56–62. Sorokin A.N., Solov'ev M.V., Raevskii K.P., et al. Yersiniosis: features of the course, diagnosis and treatment. *Voenno-meditsinskii zhurnal*. 2023;344(3):56–62.
DOI: https://doi.org/10.52424/00269050_2023_344_3_56
EDN: https://elibrary.ru/vbholr
7. Оспанбекова Н.К., Дмитровский А.М., Оспанбекова А.К. Спектр клинических проявлений заболеваний, обусловленных представителями рода иерсиния (иерсиниозов) у взрослых больных, госпитализированных в инфекционную больницу. *Sciences of Europe*. 2021;1(83):6–9. Ospanbekova N.K., Dmitrovskii A.M., Ospanbekova A.K. The spectrum of clinical manifestations of diseases caused by representatives of the genus yersinia (yersiniosis) in adult patients admitted to an infectious diseases hospital. *Sciences of Europe*. 2021;1(83):6–9.
DOI: https://doi.org/10.24412/3162-2364-2021-83-1-6-9
EDN: https://elibrary.ru/nzrrjz
8. Литвин В.Ю., ред. Потенциально патогенные бактерии в природе. М.;1991. Litvin V.Y., ed. Potentially pathogenic bacteria in nature. Moscow;1991.
9. Pushkareva V.I. Bacterial pathogens: migration from environmental reservoirs to human host. *Biology Bulletin Reviews*. 2020;10:150–7.
DOI: https://doi.org/10.1134/S2079086420020073
10. Pereg L., Steffan J.J., Gedeon C., et al. Medical geology of soil ecology. In: *Practical Applications of Medical Geology*. Cham;2021:343–401.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-53893-4_12
11. Bachman M., Lamps L.W. Infections of the gastrointestinal tract. In: Wang H.L., Chen Z.E., eds. *Practical Gastrointestinal Pathology. Practical Anatomic Pathology*. Cham;2020:223–65.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-51268-2_10
12. Nieder R., Benbi D.K., Reichl F.X. Soil as a transmitter of human pathogens. In: *Soil Components and Human Health*. Dordrecht;2018:180–9.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-024-1222-2_13
13. Ющенко Г.В. *Экологические аспекты эпидемиологии иерсиниоза и псевдотуберкулёза:* Автореф. дисс. … д-ра мед. наук. М.;1989. Yushchenko G.V. *Ecological aspects of epidemiology of yersiniosis and pseudotuberculosis:* Diss. Moscow;1989. EDN: https://elibrary.ru/zkcqfv
14. Шерхова Д.З., Хутинаева Э.Б. Иерсиниозы: этиология, патогенез, клиника и лечение. *Молодой учёный*. 2022;(3):55–7. Sherkhova D.Z., Khutinaeva E.B. Iersiniozy: etiologiya, patogenez, klinika i lechenie. *Young Scientist*. 2022;(3):55–7.
EDN: https://elibrary.ru/ttoxal
15. Su X., Yin X., Liu Y., et al. Gut dysbiosis contributes to the imbalance of Treg and Th17 cells in graves' disease patients by propionic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2020;105(11):dgaa511.
DOI: https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa511
16. Cardemil C.V., Balachandran N., Kambhampati A., et al. Incidence, etiology, and severity of acute gastroenteritis among prospectively enrolled patients in 4 veterans affairs hospitals and outpatient centers, 2016–2018. *Clin. Infect. Dis*. 2021;73(9):e2729–38. DOI: https://doi.org/10.1093/cid/ciaa806
17. Ray L.C., Payne D.C., Rounds J., et al. Syndromic gastrointestinal panel diagnostic tests have changed our understanding of the epidemiology of Yersiniosis-foodborne diseases active surveillance network, 2010–2021. *Open Forum Infect. Dis*. 2024;11(6):ofae199.
DOI: https://doi.org/10.1093/ofid/ofae199
18. Каримова Т.В., Климов В.Т., Чеснокова М.В. Дикие птицы — природный резервуар иерсиниозов. *Вестник ИрГСХА*. 2017;(79):102–8. Karimova T.V., Klimov V.T., Chesnokova M.V. Wild birds — natural reservoir of iersiniosis. *Vestnik IrGSHA*. 2017;(79):102–8.
EDN: https://elibrary.ru/ylfxcj
19. Thapaliya D., Hanson B.M., Kates A., et al. Zoonotic diseases of swine: food-borne and occupational aspects of infection.

In: Sing A., eds. *Zoonoses: Infections Affecting Humans and Animals*. Cham;2023:1–50.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-85877-3_2-1

20. Malik Y.S., Milton A.P., Ghatak S., Ghosh S. Adaptation and evolution of bird migration. In: *Role of Birds in Transmitting Zoonotic Pathogens*. *Livestock Diseases and Management.* Singapore;2021:3–14.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-16-4554-9_1
21. Малхазова С.М., Миронова В.А., Пестина П.В., Орлов Д.С. Новые и возвращающиеся инфекции в России: медико-географический аспект. *Вестник Московского университета*. *Серия 5: География.* 2016;(5):24–32. Malkhazova S.M., Mironova V.A., Pestina P.V., Orlov D.S. Emerging and re-emerging infections in Russia: a medico-geographical aspect. *Lomonosov Geography Journal.* 2016;(5):24–32.
EDN: https://elibrary.ru/xservl
22. Ачкасова Т.А., Цилько С.В., Думова Т.В., Ачкасова Ю.Н. Актуальность эмерджентных инфекций. *Учёные записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия: Биология, химия*. 2012;25(1):21–8. Achkasova T.A., Tsil'ko S.V., Dumova T.V., Achkasova Yu.N. The relevance of emergent infections. *Scientific notes of V.I. Vernadsky Tauride National University. Series: Biology, Chemistry*. 2012;25(1):21–8. EDN: https://elibrary.ru/vebcbf
23. Макаров В.В. *Очерки истории борьбы с инфекционными болезнями*. М., 2008:25–8. Makarov V.V. *Essays on the History of the Fight Against Infectious Diseases [Ocherki istorii bor'by s infektsionnymi boleznyami]*. Moscow;2008:25–8.
24. Ценева Г.Я., ред. *Иерсинии и иерсиниозы*. СПб.;2006:4–74. Tseneva G.Ya., ed. *Yersinia and yersiniosis [Iersinii i iersiniozy]*. St. Petersburg;2006:4–74. https://elibrary.ru/hdbtor
25. Бургасова О.А., Кожевникова Г.М., Чеснокова М.А. и др. Иерсиниозы: псевдотуберкулёз и кишечный иерсиниоз. М.;2021:18–25. Burgasova O.A., Kozhevnikova G.M., Chesnokova M.A., et al. *Yersiniosis: Pseudotuberculosis and Intestinal Yersiniosis [Iersiniozy: psevdotuberkulez i kishechnyi iersinioz]*. Moscow;2021:18–25. EDN: https://elibrary.ru/tbqtmm
26. Lulu D., Nuguse A. Review on Yersiniosis and its public health importance. *International Journal of Clinical Biology and Biochemistry*. 2023;5(1):01–5.
DOI: https://doi.org/10.33545/26646188.2023.v5.i1a.31
27. Куличенко А.Н. *Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2022 г. (Аналитический обзор)*. Ставрополь;2023. Kulichenko A.N. *Epidemiological Situation of Natural Focal Infectious Diseases in the Southern and North Caucasian Federal Districts in 2022 (Analytical Review) [Epidemiologicheskaya obstanovka po prirodno-ochagovym infektsionnym boleznyam v Yuzhnom i Severo-Kavkazskom federal'nykh okrugakh v 2022 g. (Analiticheskii obzor)]*. Stavropol;2023. EDN: https://elibrary.ru/wvowyh
28. Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н. Мелкие млекопитающие как хранители и переносчики возбудителей иерсиниозных инфекций (*Yersinia enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*). *Theriologia Ukrainica*. 2020;19:5–8. Evstaf'ev I.L., Tovpinets N.N. Small mammals as guardians and carriers of pathogens of Yersinia infections (*Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*). *Theriologia Ukrainica*. 2020;19:5–8.
29. Алексеев А.Ф., Чирний В.И., Голковский Г.М., Богатырева Л.М. Природная очаговость кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза в Крыму. В кн.: Эпизоотология, эпидемиология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней, общих для человека и животных: сборник материалов Всесоюзной конференции (ДСП). Львов; 1988. Alekseev A.F., Chirnii V.I., Golkovskii G.M., Bogatyreva L.M. Natural foci of intestinal yersiniosis and pseudotuberculosis in the Crimea. In: *Epizootology, Epidemiology, Diagnostic Tools, Therapy and Specific Prevention of Infectious Diseases Common to Humans and Animals: A Collection of Materials of the All-Union Conference (DSP) [Epizootologiya, epidemiologiya, sredstva diagnostiki, terapii i spetsificheskoi profilaktiki infektsionnykh boleznei, obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh: sbornik materialov Vsesoyuznoi konferentsii (DSP)]*. Lviv;1988.
30. Шикулов В.А., Хайтович А.Б., Богатырева Д.М. и др. Находки иерсиниозов в Крыму. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1989;66(7):36–7. Shikulov V.A., Khaitovich A.B., Bogatyreva D.M., et al. Findings of yersiniosis in the Crimea. *Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*. 1989;66(7):36–8.
31. Москалёв А.В., Астапенко П.В., Апчел В.Я., Цинцадзе О.Г. Современная характеристика активности природных очагов зоонозных инфекций Крыма. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2016;(3):117–21. Moskalev A.V., Astapenko P.V., Apchel V.Ya., et al. Modern characteristic of activity of zoonotic infections natural centres in Crimea. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2016;(3):117–21.
EDN: https://elibrary.ru/yjmfrr
32. Товпинец Н.Н., Евстафьев И.Л. Природная очаговость зоонозных инфекций в Крыму: эпизоотологический и эпидемиологический аспекты. *Вопросы развития Крыма.* 2003;(15):94–104. Tovpinets N.N., Evstaf'ev I.L. Natural foci of zoonotic infections in Crimea: epizootological and epidemiological aspects. *Issues of Development of the Crimea.* 2003;(15):94–104.
33. Владычак В.В., Кобечинская В.Г., Коваленко И.С. и др. Результаты эколого-топологического мониторинга мелких млекопитающих Крыма с учётом их природно-очаговой зоонозности. *Экосистемы*. 2022;(29):70–9. Vladychak V.V., Kobechinskaya V.G., Kovalenko I.S., et al. Results of ecological and topological monitoring of small mammals of the Crimea, taking into account their natural focal zoonosis. *Ecosystems*. 2022;(29):70–9. EDN: https://elibrary.ru/kfcyvq
34. Бутянова Н.Г., Дроздов В.Н., Махмудов О.С. *Псевдотуберкулез (дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка) и другие иерсиниозы у детей*. Кемерово; 1991: 54–68. Butyanova N.G., Drozdov V.N., Makhmudov O.S. *Pseudotuberculosis (Far Eastern Scarlet Fever) and other yersinioses in children [Psevdotuberkulez (dal'nevostochnaya skarlatinopodobnaya likhoradka) i drugie iersiniozy u detei]*. Kemerovo;1991:54–68.

Информация об авторах

Беднарская Елена Владимировна✉ — зоолог эпидемиологического отдела Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе, Симферополь, Россия, elenabernadsckaya@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0002-7129-6008

Дмитренко Наталья Борисовна — биолог лаборатории особо опасных инфекций Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе, Симферополь, Россия, nata.dmitrencko@mail.ru, https://orcid.org/0009-0005-8078-6430

Беркович Наталья Александровна — врач-эпидемиолог, зав. эпидемиологическим отделом Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе, Симферополь, Россия, epid@cge-crimea.ru, https://orcid.org/0009-0004-2458-0211

Проскурнин Роман Владимирович — главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе, Симферополь, Россия, fbuz_priemn@cge-crimea.ru, https://orcid.org/0009-0002-7231-8184

Участие авторов: *Беднарская Е.В.* — концепция и дизайн исследования, сбор данных; *Дмитренко Н.Б.* — сбор данных; *Беркович Н.А.* — анализ и интерпретация результатов: *Проскурнин Р.В.* — подготовка 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 17.05.2024;
принята к публикации 01.08.2024;
опубликована 30.01.2025

Information about the authors

Elena V. Bednarskaya✉ — zoologist, Epidemiological department, Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the Federal City of Sevastopol, Simferopol, Russia, elenabernadsckaya@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0002-7129-6008

Nataliia B. Dmitrencko — biologist, Laboratory of especially dangerous infections, Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the Federal City of Sevastopol, Simferopol, Russia, nata.dmitrencko@mail.ru, https://orcid.org/0009-0005-8078-6430

Nataliia A. Berkovich — epidemiologist, Head, Epidemiological department, Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the Federal City of Sevastopol, Simferopol, Russia, epid@cge-crimea.ru, https://orcid.org/0009-0004-2458-0211

Roman V. Proskurnin — medical director, Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the Federal City of Sevastopol, Simferopol, Russia, fbuz_priemn@cge-crimea.ru, https://orcid.org/0009-0002-7231-8184

Authors' contribution: *Bednarskaya E.V.* — study conception and design, data collection; *Dmitrencko N.B.* — data collection; *Berkovich N.A.* — analysis and interpretation of results; *Proskurnin R.V.* — draft manuscript preparation. 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 17.05.2024;
accepted for publication 01.08.2024;
published 30.01.2025

ОБЗОРЫ

Обзор
https://doi.org/10.36233/0372-9311-597

Резистотипы как характеристика сообществ микроорганизмов, ассоциированных со здоровьем человека. Систематический обзор

Павленко А.В.✉, Сонец И.В., Манолов А.И., Старикова Е.В., Ильина Е.Н.

Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Понятие резистотипа представляет собой новую характеристику бактериальных сообществ, отличную от их таксономического состава. Сейчас термином «резистотип» принято обозначать специфические кластеры внутри резистома, обладающие характерным фенотипическим профилем или набором генов резистентности к антимикробным препаратам. В отличие от традиционных подходов, которые фокусируются на отдельных генах резистентности или фенотипических проявлениях устойчивости, анализ резистотипов позволяет рассматривать устойчивость на более комплексном уровне, объединяя различные гены и их взаимодействия в рамках микробных популяций или целого микробного сообщества.

Цели и задачи обзора: проанализировать и обобщить актуальные данные о способах выявления и анализа резистотипов отдельных видов микроорганизмов и бактериальных сообществ.

Проведён анализ источников литературы, посвящённых выявлению резистотипов отдельных видов бактерий и бактериальных сообществ человека и сельскохозяйственных животных за прошедшие 10 лет.

На текущий момент выявление резистотипов микроорганизмов не является распространённой практикой для исследований, связанных с анализом резистентности. Для определения резистотипов изолятов бактерий используются фенотипические методы исследования, редко дополняемые генетическими или геномными данными. Для установления резистома и резистотипов сообществ микроорганизмов используются методы метагеномного секвенирования и биоинформатического анализа.

Заключение. Выявление резистотипов даёт дополнительную оценку резистома в различных популяциях микроорганизмов. Анализ резистотипов может быть применён как в клинической практике — для подбора наиболее подходящего метода терапии, так и в сельском хозяйстве — для улучшения контроля за антибиотикоустойчивостью микроорганизмов, патогенных для животных.

Ключевые слова: *резистотип, резистом, бактерии, бактериальные сообщества, систематический обзор*

Источник финансирования. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-15-00419).

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

Для цитирования: Павленко А.В., Сонец И.В., Манолов А.И., Старикова Е.В., Ильина Е.Н. Резистотипы как характеристика сообществ микроорганизмов, ассоциированных со здоровьем человека. Систематический обзор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):112–126.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-597
EDN: https://www.elibrary.ru/zrutam

Review
https://doi.org/10.36233/0372-9311-597

Resistotypes as a characterization of microbial communities associated with human health. Systematic Review

Alexander V. Pavlenko✉, Ignat V. Sonets, Aleksandr I. Manolov, Elizaveta V. Starikova, Elena N. Ilina

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia

© Павленко А.В., Сонец И.В., Манолов А.И., Старикова Е.В., Ильина Е.Н., 2025

Abstract

The concept of resistotype represents a new characterization of bacterial communities distinct from their taxonomic composition. The term “resistotype” is now commonly used to refer to specific clusters within a resistome that possess a characteristic phenotypic profile, or set of antimicrobial resistance genes. In contrast to traditional approaches that focus on individual resistance genes or phenotypic manifestations of resistance, resistome analysis allows resistance to be considered at a more comprehensive level, integrating different genes and their interactions within microbial populations or an entire microbial community.

The **aims** and objectives of the review are to analyze and summarize current data on how resistotypes of individual microbial species and bacterial communities are identified and analyzed.

Literature sources devoted to the identification of resistotypes of individual bacterial species and bacterial communities of humans and farm animals over the past 10 years were analyzed.

At the current moment, identification of microorganism resistotypes is not a common practice for studies related to resistance analysis. Phenotypic research methods, rarely supplemented by genetic or genomic data, are currently used to identify resistotypes of bacterial isolates. Metagenomic sequencing and bioinformatics analysis methods are used to identify resistome and resistotypes of microbial communities.

Conclusion. Identification of resistotypes provides additional assessment of resistome in different microbial populations. Resistotype analysis can be applied both in clinical practice, to select the most appropriate method of therapy, and in agriculture, to improve the control of antibiotic resistance of microorganisms pathogenic to animals.

Keywords: *resistotype, resistome, bacteria, bacterial communities, systematic review*

Funding source. The work was supported by the grant from the Russian Science Foundation (project No. 24-15-00419).

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

For citation: Pavlenko A.V., Sonets I.V., Manolov A.I., Starikova E.V., Ilina E.N. Resistotypes as a characterization of microbial communities associated with human health. Systematic review. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):112–126.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-597
EDN: https://www.elibrary.ru/zrutam

Интенсивное использование антимикробных препаратов приводит к увеличению количества генов резистентности как среди микроорганизмов, ассоциированных с биотопами тела человека, так и среди микроорганизмов, находящихся в его среде обитания. К последним могут относиться микроорганизмы, населяющие биотопы сельскохозяйственных и домашних животных, а также находящиеся в почве или на поверхностях предметов, окружающих человека. По данным Всемирной организации здравоохранения, около 50% антибактериальных препаратов используются не по назначению врача[1]. При этом, даже если человек не употребляет антибактериальные препараты, он всё равно может быть подвержен воздействию бактерий внешней среды, что может привести к распространению генов антибиотикорезистентности (АБР) в его собственной микрофлоре. Гены АБР могут быть приобретены не только комменсальной микрофлорой организма человека, но и патогенными или условно-патогенными микроорганизмами, что может существенно осложнить лечение инфекционных заболеваний.

Совокупность всех генов АБР, находящихся в одном биотопе, называют резистомом. Резистом биотопов, относящихся к организму человека, формируется в основном за счёт комменсальной микрофлоры, гены резистентности патогенных микроорганизмов составляют лишь небольшую его часть [1].

Использование полногеномного метагеномного секвенирования позволяет выявить большинство генов АБР, составляющих резистом, в том числе гены АБР в составе геномов некультивируемых микроорганизмов. Данный подход применяется в настоящее время для объективной характеристики резистома и последующего выявления резистотипов. Термин «резистотип» всё чаще можно встретить в научной литературе. Резистотипами принято называть специфические кластеры внутри резистома, обладающие характерным фенотипическим профилем или набором генов резистентности к антимикробным препаратам [2, 3].

Цели и задачи данного обзора: проанализировать и обобщить актуальные данные о способах выявления и анализа резистотипов отдельных видов микроорганизмов и бактериальных сообществ.

Поиск источников литературы осуществляли с использованием базы данных PubMed по запросу «resistotypes[text] OR resistotype[text]» (дата запроса 06.08.2024). Были рассмотрены полнотекстовые статьи, опубликованные в период с 2014 по 2024 г. Также был проведён поиск релевантных статей в базе данных Google Scholar по запросу «resistotype» за тот же период. В исследование были включены

[1] Организация Объединённых Наций. Злоупотребление антибиотиками приводит к росту смертности от инфекций. URL: https://news.un.org/ru/story/2019/11/1367331

© Pavlenko A.V., Sonets I.V., Manolov A.I., Starikova E.V., Ilina E.N., 2025

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-597

работы, в которых описаны отдельные резистотипы бактерий или микробных сообществ. Из результатов поиска были исключены работы, для которых не было возможности получить полный текст статьи, а также статьи, написанные не на английском языке (русскоязычных публикаций по данной теме не найдено, в том числе в базе данных eLIBRARY). В базе данных PubMed были обнаружены 43 статьи по вышеуказанному запросу. Также 5 статей были дополнительно включены в обзор на основании результатов поиска в базе данных Google Scholar (**рис. 1**). Из анализа были исключены 2 публикации на турецком языке и 22 статьи, в которых отсутствовало описание отдельных резистотипов.

В общей сложности на основании приведённых критериев включения/исключения были отобраны 24 публикации, вошедшие в настоящий обзор. Все проанализированные статьи описывали резистотипы отдельных изолятов бактерий или метагеномных сообществ как человека, так и сельскохозяйственных животных. Для определения резистотипов изолятов бактерий во всех публикациях использовали фенотипические методы исследования, редко дополняемые генетическими или геномными данными. Для определения резистома и резистотипов сообществ микроорганизмов применяли методы метагеномного секвенирования и биоинформатического анализа (**табл. 1**).

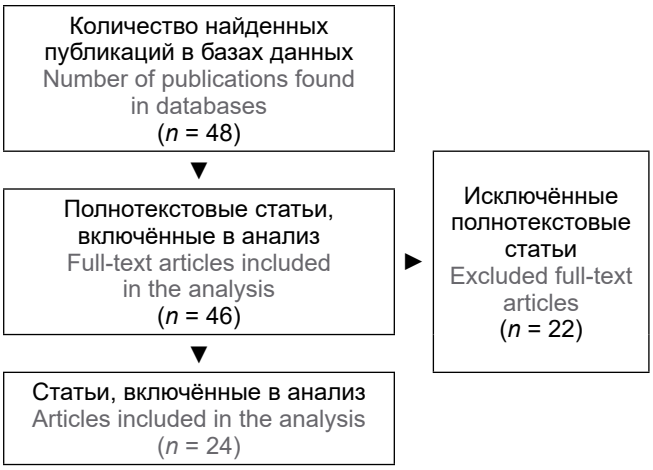


Рис. 1. Схема отбора публикаций для обзора.
Fig. 1. Scheme for selecting publications for review.

Резистотипы отдельных видов бактерий

Исследования, описывающие резистотипы отдельных видов бактерий, в настоящий момент посвящены либо анализу клинических изолятов, выделенных из образцов пациентов с различными инфекционными заболеваниями, либо анализу бактериальных изолятов, выделенных из образцов больных сельскохозяйственных животных. Для определения резистотипов у отдельных видов бактерий используются как классический диско-диффузионный метод определения фенотипической чувствительности к антибиотикам (АБ), так и методы генетического тестирования и полногеномного секвенирования. Рассмотренные в данном разделе обзора публикации можно условно разделить на две группы:

- работы, описывающие резистотипы клинически значимых для человека бактерий [2–4, 7–20];
- работы, описывающие резистотипы возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных [21–27].

Резистотипы клинически значимых бактерий

Традиционным подходом к определению резистотипов отдельных видов микроорганизмов является применение фенотипических методов тестирования чувствительности к АБ, при этом подавляющее большинство исследований посвящено изучению микроорганизмов, входящих в число патогенов группы ESKAPE. В частности, в исследовании B. Pérez-Viso и соавт. приводятся результаты идентификации резистотипов изолятов бактерий *Escherichia coli* (*n* = 9514), *Klebsiella pneumoniae* (*n* = 2137) и *Enterobacter cloacae* (*n* = 516) на основании диско-диффузионного тестирования чувствительности к ампициллину, цефалотину, цефокситину, амоксицилину и клавулановой кислоте [8]. В результате исследования были обнаружены 5 вариантов резистотипов бактериальных изолятов, из которых 4 варианта встречались у всех 3 видов бактерий (**табл. 2**).

Некоторые из проанализированных изолятов не попадали ни в одну из описанных 4 групп. Спектры резистентности этих изолятов были различны для разных видов бактерий.

Относительная распространённость резистотипов внутри одного вида бактериальных изолятов была различна для разных видов. Если в изолятах *E. coli* наиболее распространены резистотипы дикого типа и BSBL-типа (49 и 37% соответственно), то в изолятах *K. pneumoniae* и *E. cloacae* преобладали

Таблица 1. Распределение публикаций по объекту исследования и применяемым методам определения резистотипов
Table 1. Distribution of publications by object of study and methods used to determine resistotypes

Тип исследований Type of research	Объект | Object	
	человек human	сельскохозяйственные животные farm animals
Метагеномные исследования Metagenomic studies	6	1
Фенотипические методы/изоляты Phenotypic methods/isolates	11	6

Таблица 2. Характеристики резистотипов из публикации B. Pérez-Viso и соавт. [7]
Table 2. Characteristics of resistotypes from the publication B. Pérez-Viso et al. [7]

Обозначение резистотипа в тексте публикации Resistotype designation in the text of the publication	Особенности Features	Чувствительность к АБ Antibiotic sensitivity	Устойчивость к АБ Antibiotic resistance	Связь с носителями, если указана Association with carriers, if specified	Размер когорты Cohort size
Wild-type	–	Все протестированные All tested	–	*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*	7101
BSBL resistotype	Наличие β-лактамазы широкого спектра (БЛРС), отсутствие БЛРС Presence of broad-spectrum beta-lactamases, absence of extended-spectrum β-lactamases	Цефалотин, цефокситин Cephalothin, cefoxitin	Ампициллин Ampicillin	*E. coli*	3653
ESBL resistotype	Наличие БЛРС, отсутствие β-лактамазы *ampC* и карбапенемазы Presence of extended-spectrum β-lactamases, absence of β-lactamase *ampC* and carbapenemase		Цефалоспорины Cephalosporins	*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*	1217
AmpC resistotype	Наличие *ampC* β-лактамазы, отсутствие карбапенемазы и БЛРС Presence of *ampC* β-lactamase, absence of carbapenemase and extended-spectrum β-lactamases		Цефалоспорины и клавулановая кислота Cephalosporins and clavulanic acid	*E. coli*, *K. pneumoniae*	195

резистотип дикого типа и группа неклассифицированных резистотипов. При этом резистотип BSBL был идентифицирован только у изолятов *E. coli*. Хотя в данной публикации приводится подробная характеристика резистотипов изолятов, существенным её недостатком является отсутствие анализа по сопоставлению резистотипов с метаданными пациентов, из образцов которых были выделены анализируемые изоляты [8].

Среди других публикаций, посвящённых анализу резистотипов отдельных бактерий, встречаются работы, аналогичным образом описывающие резистотипы *K. pneumoniae* [12, 15–17], *Pseudomonas aeruginosa* [11, 18], *Acinetobacter* spp. [11, 13, 15, 17], а также *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus, Enterobacter* spp. [15] и *Stenotrophomonas maltophilia* [14]. Во всех вышеприведённых публикациях установление резистотипа бактерий проводилось путём тестирования их чувствительности к АБ диско-диффузионным методом или с помощью Е-тестов.

Недавно было опубликовано исследование, демонстрирующее изменчивость резистотипов изолятов *Burkholderia cenocepacia*, выделенных из мокроты пациента с муковисцидозом [9]. У 1 пациента в течение 63 мес (более 5 лет) собирали образцы мокроты, из которых выделяли изоляты *B. cenocepacia*. Полученные изоляты тестировали на чувствительность к цефтазидиму, меропенему, миноциклину и триметоприму-сульфаметоксазолу. Всего было проанализировано 11 изолятов, каждый из которых обладал уникальным резистотипом (**рис. 2**). В данной статье термином «резистотип» авторы обозначали определённый профиль АБР, характерный для изолята, при этом резистотипы могли меняться с течением времени. Если изолят, выделенный в начале исследования, был чувствителен ко всем 4 АБ, то у изолятов, выделенных в последующие месяцы, профиль устойчивости менялся, при этом наблюдаемые изменения не всегда были связаны с увеличением резистентности. Изолят, устойчивый ко всем 4 АБ, был получен только на 18-м месяце исследования и в последующие месяцы более не выявлялся.

Наиболее характерным исследованием, описывающим установление резистотипа бактерий путём сочетания фенотипического и генетического тестирований, является публикация [7], посвящённая изучению микробиологических и клинических характеристик бактерий рода *Serratia*, где приводятся результаты работы, проводившейся в течение 16 лет (2005–2020 гг.). Серрации — условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие у человека гнойно-воспалительные заболевания различной локализации. Наиболее изученным видом этого рода является *S. marcescens*. Данный патоген является возбудителем диарейных заболеваний, менингита, артрита, сепсиса и инфекций мочевыводящих путей. Виды рода *Serratia* считаются одними из основных источников бактериемии в

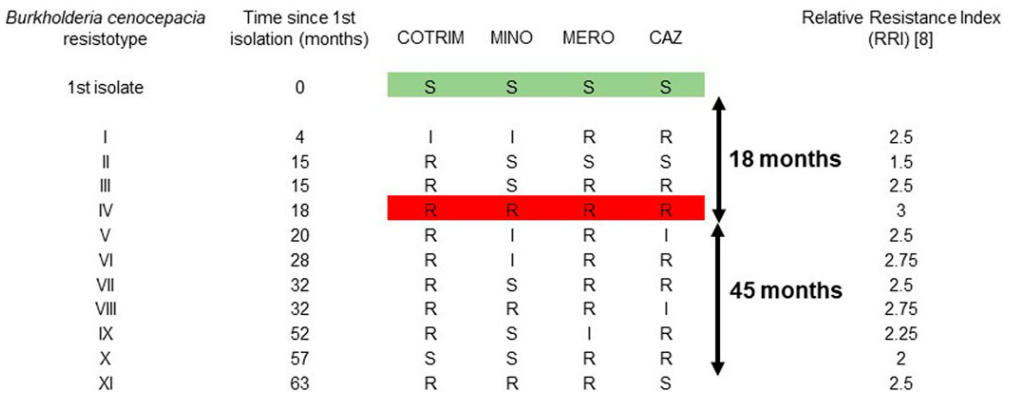


Рис. 2. Описание 11 резистотипов изолятов *B. cenocepacia*, выделявшихся из образцов взрослого пациента с муковисцидозом в течение 63 мес.

Профили резистотипов основаны на чувствительности изолятов к 4 АБ (цефтазидиму, меропенему, миноциклину и триметоприм-сульфаметоксазолу). S — чувствительный; I — промежуточно устойчивый; R — устойчивый. CAZ — цефтазидим; COTRIM — триметоприм-сульфаметоксазол; MERO — меропенем; MINO — миноциклин. Данные приводятся по публикации [9].

Fig. 2. Description of 11 resistotypes of *B. cenocepacia* isolates from adult cystic fibrosis patient samples over a period of 63 months.

Resistotype profiles were based on the sensitivity of the isolates to 4 antibiotics (ceftazidime, meropenem, minocycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole). S, sensitive; I, intermediately resistant; R, resistant. CAZ, ceftazidime; COTRIM, trimethoprim-sulfamethoxazole; MERO, meropenem; MINO, minocycline. Data are based on the publication [9].

перинатальных центрах. Вошедшие в цитируемое исследование изоляты *Serratia* spp. были выделены из образцов пациентов университетской больницы Рамона и Кохаля (Мадрид), возраст которых составлял от 21 дня до 97 лет. Для проведения полногеномного секвенирования и последующего анализа резистома *Serratia* spp. было отобрано 107 изолятов.

В результате проведённого биоинформатического анализа среди проанализированной выборки изолятов были выявлены 4 резистотипа (**табл. 3**).

Резистотип I (гены *aac6-Ic, blaSST-1* и *tet41*) и резистотип II (*aac6-Ic* и *blaSRT-1*) были представлены наиболее часто (58 и 34,6% соответственно). Резистотип III выявлен у 6 изолятов, продуцирующих карбапенемазы (*aac6-Ic, aadA1, blaSRT-1, blaVIM-1, tet41, sul1, catA1, catB2, dfrB1, mphE, msrE*), а резистотип IV был представлен 2 штаммами, продуцирующими БЛРС *blaSHV-12* (*aac6-Ic, blaSRT-1, blaSHV-12, blaLAP-2* и *qnr-S1*).

Гены *blaSST-1* и *blaSRT-1*, кодирующие индуцируемые β-лактамазы *ampC* в геномах *S. marcescens*, были обнаружены во всех изолятах. Их фенотипическое проявление наблюдалась у 89,7% протестированных изолятов, восприимчивых к цефотаксиму (87 из 97 изолятов). В цитируемой работе приводит-

Таблица 3. Характеристики резистотипов *Serratia* spp. из публикации [7]
Table 3. Characteristics of *Serratia* spp. resistotypes from article [7]

Обозначение резистотипа в тексте публикации Resistotype designation in the text of the publication	Основные гены-драйверы резистотипа Major driver genes of resistotype	Устойчивость к АБ Antibiotic resistance	Связь с носителями Association with carriers	Размер когорты Cohort size
Resistotype 1	*aac6-Ic, blaSST-1, tet41*	Аминогликозиды, β-лактамы, тетрациклин Aminoglycosides, β-lactams, tetracycline	*S. marcescens, S. nematodiphila, S. ureilytica*	62
Resistotype 2	*aac6-Ic, blaSRT-1, blaSHV-12, blaVIM-1, cmlB1*	Аминогликозиды, β-лактамы, карбапенемы, цефалоспорины, хлорамфеникол Aminoglycosides, β-lactams, carbapenems, cephalosporins, chloramphenicol		37
Resistotype 3	*aac6-Ic, aadA1, blaSRT-1, blaVIM-1, tet41, sul1, catA1, catB2, dfrB1, mphE, msrE*	Аминогликозиды, β-лактамы, карбапенемы, тетрациклины, макролиды Aminoglycosides, β-lactams, carbapenems, tetracyclines, macrolides		6
Resistotype 4	*aac6-Ic, blaSRT-1, blaSHV-12, blaLAP-2, qnr-S1*	Аминогликозиды, β-лактамы, карбапенемы, фторхинолоны Aminoglycosides, β-lactams, carbapenems, fluoroquinolones		2

ся подробное описание выявленных резистотипов *Serratia* spp., однако не проводится сопоставление резистотипов с метаданными пациентов, из образцов которых проанализированные изоляты были выделены [7].

Резистотипы возбудителей инфекций сельскохозяйственных животных

Резистом возбудителей инфекционных заболеваний животных является предметом активного изучения исследователей, в том числе ввиду тесного контакта человека с сельскохозяйственными животными. Например, S. Chhabra и соавт. описали резистотипы изолятов бактерии *Rhodococcus equi*, выделенных из образцов жеребят с респираторными заболеваниями [20]. Данный патоген присутствует в почве, а также в кишечном тракте крупного рогатого скота, лошадей, овец, свиней и некоторых других животных. Он может являться причиной респираторных заболеваний у жеребят в возрасте 1–4 мес. *R. equi* считается серьёзной угрозой для коневодства ввиду высокой заболеваемости и смертности среди инфицированных молодых лошадей. В вышеприведённой работе исследовали 28 клинических изолятов *R. equi*, полученных из образцов жеребят с респираторными заболеваниями из различных частей штатов Харьяна и Раджастан в Индии. Собранные изоляты проверяли на устойчивость к 33 АБ диско-диффузионным методом. Все изоляты показали одинаковые результаты устойчивости к 29 АБ. Различия в профилях устойчивости наблюдали только по отношению к 4 антимикробным препаратам: амоксициллину, гентамицину, колистину и стрептомицину. На основе этих различий были выделены 10 резистотипов (R1–R10). Наиболее часто встречались резистотипы R1 (устойчивость к амоксициллину, гентамицину и стрептомицину; чувствительность к колистину) и R4 (устойчивость к гентамицину и стрептомицину; чувствительность к амоксициллину и колистину). В статье подчёркивается, что изучение резистотипов может помочь в определении источника инфекции и распространения болезни, а также может быть использовано для выбора эффективной терапии и контроля заболеваемости в конкретной географической зоне или на конкретной ферме.

Похожая работа была проведена с изолятами *Enterococcus* spp., полученными из образцов птиц 40 птицефабрик Сербии [22]. Чувствительность изолятов к АБ также определяли диско-диффузионным методом. В исследовании были выявлены разные виды рода *Enterococcus* с различными профилями устойчивости, в том числе *E. faecalis, E. faecium, E. hirae, E. durans* и *E. thialandicus*. При этом *E. faecalis* и *E. faecium* в наибольшей степени были ассоциированы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) к АБ. В данной работе выявлено 18 резистотипов, ассоциированных с устойчивостью к различным классам АБ. Например, выявлялись резистотипы, характеризующиеся устойчивостью исключительно к тетрациклину и доксициклину, в то время как для других резистотипов была характерна МЛУ к нескольким классам АБ. Выявленные штаммы с МЛУ могут представлять риск как для здоровья птиц, так и для здоровья человека, поскольку они могут способствовать распространению устойчивости к АБ через пищевую цепочку.

Крупное исследование J. Alvarez и соавт. было посвящено анализу резистотипов 3047 изолятов сальмонелл, выделенных из фекалий фермерских птиц (кур-несушек, цыплят-бройлеров и индеек) в Испании [24]. Чувствительность к 9 АБ (ампициллину, ципрофлоксацину, налидиксовой кислоте, хлорамфениколу, гентамицину, сульфаметоксазолу, тетрациклину, триметоприму и колистину) определяли с использованием метода серийных разведений. В исследовании было выявлено 94 резистотипа, из которых 33 встречались у всех видов птиц, 19 были характерны только для цыплят-бройлеров, 22 — для индеек, 3 — для кур-несушек.

Подобные исследования, описывающие резистотипы бактериальных патогенов сельскохозяйственных животных, были также проведены на птицефермах Зимбабве (для изолятов *Salmonella enteritidis* [23]) и Италии (для изолятов *Campylobacter jejuni* [24]). Также в исследовании D. Cid и соавт. были описаны резистотипы изолятов *Pasteurella multocida*, выделенных из образцов свиней и овец [25].

Таким образом, в рассмотренных публикациях под термином «резистотип» понимается определённый фенотип устойчивости микроорганизмов к набору АБ, выявляемый диск-диффузионным методом, методом серийных разведений или методом тест-полосок E-test.

Резистотипы комменсальных микробных сообществ

Микробиом, ассоциированный с организмом хозяина (человека или животного), представляет собой сложное и динамичное сообщество множества видов микроорганизмов: бактерий, архей, вирусов и грибов, населяющих различные биотопы — преимущественно кожу, слизистые и желудочно-кишечный тракт. Микробиом играет важную роль в поддержании здоровья организма хозяина и может быть ассоциирован с рядом заболеваний [28]. Лекарственные препараты, воздействующие на организм хозяина, также оказывают воздействие на микробиом, при этом наиболее выраженный эффект наблюдается для антимикробных препаратов [29, 30].

Даже здоровый человек, не принимающий АБ, постоянно контактирует с устойчивыми к АБ

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-597

микроорганизмами, носителями которых могут выступать другие люди либо домашние животные. Это приводит к тому, что гены АБР могут попадать в его собственную микробиоту, становясь частью индивидуального резистома. Такие события наиболее вероятны в популяциях с большой частотой потребления АБ [31].

При определении резистомов и резистотипов микробных сообществ используются исключительно методы генетического тестирования, в отличие от работ по исследованию резистотипов отдельных видов бактерий. Из генетических методов, применяемых для анализа резистома, наиболее информативным является метагеномное секвенирование с последующим биоинформатическим анализом.

Первое упоминание термина «резистотип» применительно к микробным сообществам, ассоциированным с телом человека, относится к исследованию 2013 г. [3]. В данном исследовании был проведён анализ резистотипов микробиоты кишечника на основании метагеномных данных 275 здоровых добровольцев из Америки, Дании, Испании, Франции, Италии, Японии, Китая и Индии. В ходе анализа было выявлено присутствие потенциальных генов устойчивости к 53 различным АБ. В выборку вошли взрослые без серьёзных патологий (267 образцов), дети (4 образца) и младенцы (4 образца), что позволило провести сравнительный анализ резистотипов различных возрастных групп.

Для каждого метагенома были получены данные о распространённости генов АР. Гены, встречающиеся менее чем в 10% метагеномов, были исключены из анализа. Для полученных профилей представленности был выполнен Between Class Analysis (модификация Principal component analysis, более устойчивая к выбросам и зашумленности данных). В исследовании были идентифицированы 4 резистотипа методом кластерного анализа (**табл. 4**).

Резистотип 1 включал большинство исследуемых образцов микробиоты кишечника. Данный резистотип авторы разделили на 3 подтипа: 1A, 1B и 1C. Резистотип 1A был наиболее распространён среди европейских и японских участников исследования. В состав резистотипа 1B вошли образцы из разных регионов, выраженной географической специфики для данного подтипа не наблюдалось. Резистотип 1C включал значительное количество образцов из США (около 60% американских микробиомов). Данный резистотип характеризовался более высокой устойчивостью к фосмидомицину и цефалоспоринам, что может быть связано с особенностями использования этих АБ в США.

Резистотип 2 был специфичен для китайской популяции (24 из 30 китайских образцов), также для него было характерно высокое содержание генов устойчивости к тетрациклинам, линкомицинам и макролидам. Это отражает особенности использования АБ в Китае, где отмечается более широкое их применение по сравнению с другими странами [32].

В исследовании MetaHIT выявлены значимые географические различия в количестве идентифицируемых генов АБР [32]. В частности, в кишечнике людей из Южной Европы обнаружено большее количество генов АБР по сравнению с жителями Северной Европы и США. У детей из Японии было обнаружено большее количество генов АБР по сравнению с детьми из Индии, но здесь надо сделать поправку на небольшую выборку: из Индии и Японии было взято всего по 2 детских образца. Стоит отметить, что у младенцев из Японии (4 образца) обнаружено высокое количество генов АБР.

В исследовании E. Ruppé и соавт., выполненном с использованием метагеномных данных, полученных в рамках консорциума MetaHIT [32], для выявления резистотипов использовали метод DMM (Dirichlet-Multinomial Mixture Models) с применением критерия Лапласа для определения оптимального количества кластеров [19]. Проанализированы 663 метагеномных образца, которые удалось кластеризовать на 6 резистотипов. Из них наиболее распространены были первые 4 резистотипа, в каждый из которых входило около 20% исследованных образцов. Пятый и шестой резистотипы присутствовали в 8,7 и 7,5% образцов соответственно. Резистотип 1 был обогащён генами устойчивости к аминогликозидам *ANT*, в резистотипе 3 преобладали гены устойчивости к тетрациклинам *tet(M)* и β-лактамазы класса C. Резистотип 4 был обогащён генами устойчивости к тетрациклинам *tet(X)* и β-лактамазами класса A, а резистотип 6 — β-лактамазами класса B1 и генами устойчивости к сульфонамидам *sul*. Резистотипы 1 и 3 имели более высокое разнообразие генов АБР и были ассоциированы с бактериальным порядком *Clostridiales*. Резистотип 4 был ассоциирован с бактериями рода *Bacteroides* (они содержат гены *tet(X)* и β-лактамазы класса A), а резистотип 6 — с бактериями рода *Prevotella*.

За последние 2 года в высокорейтинговых журналах появилось несколько работ, развивающих тему характеристики резистотипов микробных сообществ, населяющих природные биотопы человека. Возможно, такой интерес к закономерностям распространения генов АБР вызван озабоченностью общества последствиями пандемии COVID-19, связанными с чрезмерным потреблением АБ[2].

В частности, K. Lee и соавт. предприняли попытку оценить влияние использования АБ на

[2] Всемирная организация здравоохранения. ВОЗ сообщает о широкой практике избыточного назначения антибиотиков госпитализированным больным с COVID-19. URL: https://www.who.int/ru/news/item/26-04-2024-who-reports-widespread-overuse-of-antibiotics-in-patients--hospitalized-with-covid-19

Таблица 4. Характеристики резистотипов бактериальных сообществ человека
Table 4. Characteristics of human bacterial community resistotypes

Объект исследования Object of study	Обозначение резистотипа в тексте публикации Resistotype designation in the text of the publication	Резистотипы (основные драйверы, если указаны) Resistotypes (main drivers, if specified)	Устойчивость к АБ Antibiotic resistance	Ассоциации с бактериями Associations with bacteria	Размер когорты Cohort size	Свойства резистотипа Resistotype properties	Источник Reference
Назофарингеальный микробиом недоношенных детей Naso-pharyngeal microbiome of preterm infants	R1	patA, patB, rlmA(II)	Фторхинолоны Fluoroquinolones	*Streptococcus mitis/oralis, Gemella haemolysans/ sanguinis*	66	Один из наиболее представленных резистотипов у недоношенных детей One of the most represented resistotypes in premature infants	[18]
	R2	SST-1, AAC(6')-Ic, tet(41), mexI	β-Лактамы, аминогликозиды, тетрациклин, МЛУ β-Lactams, aminoglycosides, tetracycline, multidrug resistance (MDR)	*S. marcescens/ nematodiphila*		Один из наиболее представленных резистотипов у недоношенных детей. Сохраняется длительное время One of the most represented resistotypes in premature infants. It persists for a long time	
	R3	blaZ	β-Лактамы β-Lactams	*S. aureus, S. epidermidis*			
Микробиом дыхательных путей при бронхоэктазах The airway microbiome in bronchiectasis	RT1	hmnM, PatA, tetB(46), ErmX	Фторхинолоны, тетрациклины, МЛУ Fluoroquinolones, tetracyclines, MDR	*Haemophilus influenzae, Rothia mucilaginosa, Streptococcus* spp.	280	RT1 — более благоприятный с клинической точки зрения профиль резистома, демонстрирующий меньшее разнообразие генов резистентности RT1 is a more clinically favorable resistome profile showing less resistance gene diversity	[2]
	RT2	mexM, basA, PA_catB7, bcr_1, APH(3")Ib	Аминогликозид, феникол, бицикломицин, МЛУ Aminoglycoside, phenicol, bicyclomycin, MDR	*P. aeruginosa, K. pneumoniae*		RT2 ассоциируется с бóльшим количеством обострений, худшей функцией лёгких и большей тяжестью заболевания RT2 is associated with more exacerbations, worse lung function, and greater disease severity	
Микробиом кишечника здоровых людей The gut microbiome of healthy individuals	Resistotype 1A		Бацитрацин, ванкомицин, тетрациклин, F3H8F5 (линкозамин, стрептограмин B и макролиды) Bacitracin, vancomycin, tetracycline, F3H8F5 (lincosamine, streptogramin B and macrolides)		267	Преимущественно выборка из Европы и Японии Predominantly sampled from Europe and Japan	[3]
	Resistotype 1B		Ванкомицин, бацитрацин, тетрациклины, цефалоспорины Vancomycin, bacitracin, tetracyclines, cephalosporins			Преимущественно выборка из Европы и США Predominantly sampled from Europe and the USA	

Продолжение табл. 4 | Continuation of the Table 4

Объект исследования Object of study	Обозначение резистотипа в тексте публикации Resistotype designation in the text of the publication	Резистотипы (основные драйверы, если указаны) Resistotypes (main drivers, if specified)	Устойчивость к АБ Antibiotic resistance	Ассоциации с бактериями Associations with bacteria	Размер когорты Cohort size	Свойства резистотипа Resistotype properties	Источник Reference
	Resistotype 1C		Фосмидомицин, цефалоспорин Fosmidomycin, cephalosporin			Преимущественно выборка из США Predominantly sampled from the US	
	Resistotype 2		Тетрациклин, F3H8F5 (линкозамин, стрептограмин B и макролиды), цефалоспорин, линкомицин, макролид, J3I4 и триметоприм Tetracycline, F3H8F5 (lincosamine, streptogramin B and macrolides), cephalosporin, lincomycin, macrolide, J3I4 and trimethoprim			Преимущественно китайская выборка Predominantly Chinese sample	
Микробиом кишечника здоровых людей The gut microbiome of healthy individuals	Background		Гликопептиды, тетрациклины Glycopeptides, tetracyclines	*Coprococcus eutactus, Eubacterium siraeum*	3034	Ассоциирован с непатогенными микроорганизмами Associated with non-pathogenic microorganisms	[4]
	FAMP		Фторхинолоны, МЛУ, полипептиды, фторхинолоны, фосфомицин, аминогликозиды, сульфонамид Fluoroquinolones, MDR, polypeptides, fluoroquinolones, fosfomycin, aminoglycosides, sulfonamide	*E. coli, Proteus mirabilis*	2338	Ассоциирован с патогенными микроорганизмами. Встречается в метагеномах больных колоректальным раком (51,9%), метаболическими заболеваниями (58,2%), кишечными инфекциями, связанными с шига-токсин-продуцирующей кишечной палочкой (79,4%) и холерой Associated with pathogenic microorganisms. Occurs in metagenomes of patients with colorectal cancer (51.9%), metabolic diseases (58.2%), intestinal infections associated with Shiga toxin-producing *E. coli* (79.4%), and cholera	
Микробиота биоплёнки ротовой полости Microbiota of the oral cavity biofilm	Resistotype 1	Высокая представленность *mefA, msrD, ermB, blaCSP(1)*. Низкая представленность *tet32* и *tetQ* High representation of *mefA, msrD, ermB, blaCSP(1).* Low representation of *tet32* and *tetQ*			179	Представлен во всех группах людей (преимущественно у здоровых и с кариесом) Prevalent in all groups of people (predominantly in healthy individuals and those with caries)	[19]

Окончание табл. 4 | End of the Table 4

Объект исследования Object of study	Обозначение резистотипа в тексте публикации Resistotype designation in the text of the publication	Резистотипы (основные драйверы, если указаны) Resistotypes (main drivers, if specified)	Устойчивость к АБ Antibiotic resistance	Ассоциации с бактериями Associations with bacteria	Размер когорты Cohort size	Свойства резистотипа Resistotype properties	Источник Reference
	Resistotype 2	Высокая представленность *ermF and tet32, tetQ*. Низкая представленность *ermB and blaCSP(1)* High representation of *ermF* and *tet32, tetQ*. Low representation of *ermB* and *blaCSP(1)*				Представлен во всех группах людей (преимущественно у здоровых и с кариесом) Present in all groups of people (predominantly in healthy individuals and those with caries)	
	Resistotype 3	Высокая представленность *pgpB*. Низкая представленность *mefA, msrD, ermF, ermB* High representation of *pgpB*. Low representation of *mefA, msrD, ermF, ermB*				Представлен только в образцах людей с пародонтитом Present only in samples of people with periodontitis	
Кишечная микробиота здоровых людей Intestinal microbiota of healthy individuals	Выявлено 6 резистотипов 6 resistotypes were identified	Резистотип 1 — *ANT*, Резистотип 3 *Tet(M)* и β-лактамазы класса C. Резистотип 4 *Tet(X)* и β-лактамазами класса A. Резистотип 6 — β-лактамазами класса B1, *Sul* Resistotype 1 is ANT, Resistotype 3 Tet(M) and class C β-lactamases. Resistotype 4 by Tet(X) and class A β-lactamases. Resistotype 6 by β-lactamases of class B1, *Sul*		Резистотипы 1 и 3 — бактериальный порядок *Clostridiales*. Резистотип 4 — бактериальный род *Bacteroides*. Резистотип 6 — род *Prevotella* Resistotypes 1 and 3 — bacterial order *Clostridiales*. Resistotype 4 — bacterial genus *Bacteroides*. Resistotype 6 — genus *Prevotella*	663	Наиболее представлены первые 4 резистотипа, в каждый из которых входило около 20% исследованных образцов. Пятый и шестой резистотипы представляли 8,7 и 7,5% соответственно The first 4 resistotypes were the most represented, each comprising about 20% of the samples studied. The fifth and sixth resistotypes represented 8.7 and 7.5%, respectively	[20]

микробиом человека на уровне популяции [4]. В исследование вошли метагеномные данные, полученные для микробиоты разных биотопов организма человека: ротовая полость, кожа, верхние дыхательные пути, влагалище, но основной массив (n = 5372) образцов составили метагеномы микробиоты кишечника. В исследование были включены метагеномы из разных стран: Австрии, Канады, Китая, Германии, Дании, Испании, Франции, Израиля, Италии, Казахстана, Мадагаскара, Нидерландов, Швеции и США. Метагеномы здоровых добровольцев составили 3565 из 8972 проанализированных образцов. Используя данную выборку, авторы показали, что представленность генов АБР коррелирует с уровнем потребления АБ на душу населения в анализируемой стране, причём такая

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-597

корреляция прослеживается в первую очередь для генов АБР, соседствующих с мобильными генетическими элементами.

При анализе вышеупомянутых образцов были идентифицированы 422 семейства генов АБР с использованием базы данных CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database). Полученные для метагеномных образцов резистомные профили кластеризовали методом NMDS (неметрического многомерного шкалирования) с использованием расстояний Брея–Кертиса, в результате чего удалось выявить 2 кластера-резистотипа. Разделение на 2 резистотипа было подтверждено с помощью методов PAM (разделение вокруг медоидов), UMAP (метод нелинейного снижения размерности данных) и k-means (метод k-средних).

При анализе частот встречаемости резистотипов и представленности генов АБР в них установлено, что резистотип с более низкой частотой встречаемости в популяции более чем в 10 раз обогащён генами устойчивости к фторхинолонам, фосфомицинам, аминогликозидам и пептидным АБ, а также генами, детерминирующими МЛУ, по сравнению с другим резистотипом, который встречается в большем количестве образцов. Первый, более редкий резистотип обозначили аббревиатурой FAMP — по первым буквам названий групп АБ, гены устойчивости к которым характерны для этого резистотипа (Fluoroquinolones, Fosfomycins, Aminoglycosides, Multi-drug resistance, Peptide antibiotics). Другой резистотип обозначили как background. Важно отметить, что для выявленных резистотипов не обнаружено связи с энтеротипами, но при этом установлены ассоциации с конкретными бактериальными таксонами. Так, виды, ассоциированные с резистотипом FAMP, преимущественно относились к группе *Proteobacteria*, в частности, к семейству *Enterobacteriaceae*. При этом была отмечена связь частоты встречаемости резистотипа FAMP с группами пациентов по состоянию здоровья: так, у здоровых пациентов доля FAMP-образцов была минимальной, в то время как чаще всего резистотип FAMP встречался в группах пациентов с кишечными инфекциями, такими как холера (83,3%) и шига-токсин-продуцирующая кишечная палочка (79,4%) (**рис. 3**).

Также в данном исследовании использовали лонгитюдные данные 12 здоровых добровольцев, получавших 4-дневный курс смеси из 3 АБ широкого спектра действия: меропенема, гентамицина и ванкомицина [34]. В результате анализа этих данных было показано, что употребление АБ приводит к переходу к FAMP-резистотипу для большинства пациентов в течение 8 дней после окончания курса АБ и сопровождается увеличением общего числа генов АБР. Данный эффект частично сохраняется через 42 дня после окончания курса, но на 180-й день после окончания курса приёма АБ пациенты возвращаются к изначальному резистотипу (background). Наблюдаемый эффект авторы связывают с генами АБР, ассоциированными с одиночными видами протеобактерий.

Авторы предполагают, что использование АБ может приводить к возникновению резистентно-

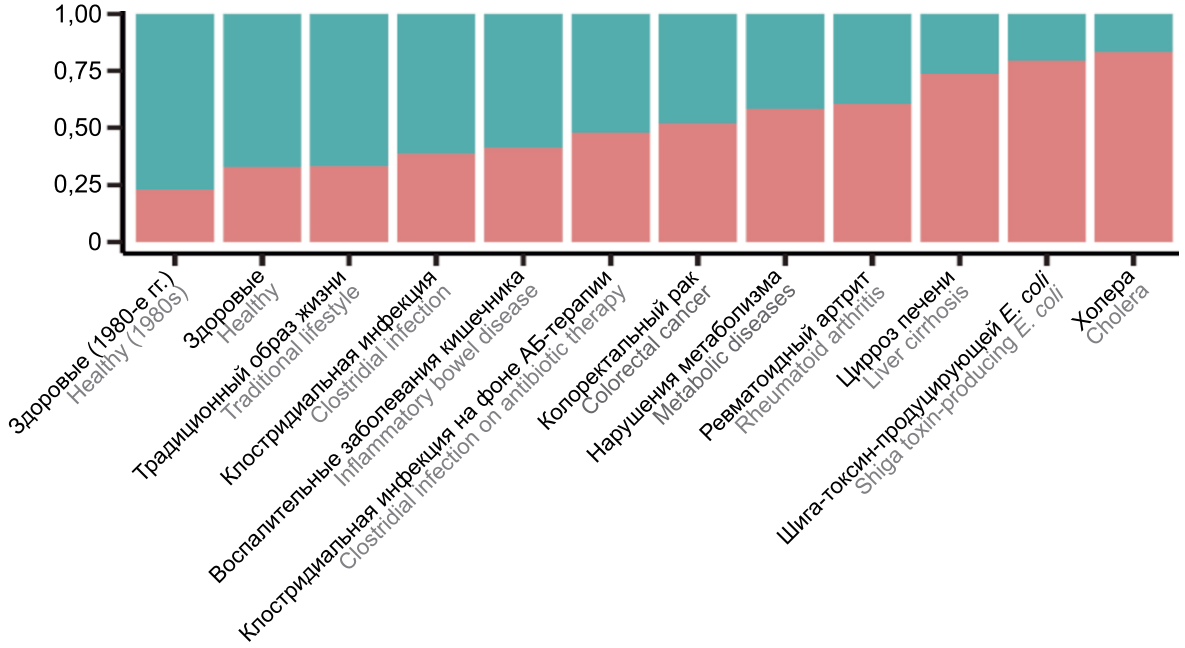


Рис. 3. Представленность резистотипов FAMP (нижняя часть столбиков) и background (верхняя часть столбиков) в микробиоте кишечника людей с разными заболеваниями [4].

Fig. 3. Representation of FAMP (bottom of the columns) and background (top of the columns) resistotypes in the gut microbiota of different categories of people [4].

сти в первую очередь у патогенных и условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов, которые могут проникать в кишечник человека при кишечных инфекциях, впоследствии передавая гены резистентности комменсальным бактериям. Авторы предполагают также, что такой процесс обмена генами устойчивости к АБ внутри микробного сообщества кишечника может занимать длительное время и скорость этого процесса может зависеть от общей интенсивности употребления АБ в популяции. Эти предположения позволяют объяснить ассоциацию резистотипа FAMP с кишечными инфекциями и протеобактериями как драйверами данного резистотипа, а также с общим уровнем потребления АБ в популяции.

Тему изменчивости резистотипов поднимают A. Dhariwal и соавт., исследовавшие формирование микробиома и резистома носоглотки у недоношенных детей с оценкой влияния раннего применения АБ на этот процесс [17]. В исследование были включены 66 недоношенных детей, образцы назофарингеального аспирата которых собирали в течение первых 6 мес жизни. Общий объём выборки составил 181 образец. По результатам метагеномного анализа с последующей обработкой данных в этой выборке были выявлены 3 основных резистотипа, характеристики которых приведены в табл. 4.

Авторы показали, что раннее применение АБ оказывало временное влияние на резистом и распределение резистотипов [17]. Воздействие АБ приводило к увеличению разнообразия и количества генов АБ-устойчивости. Однако это влияние было кратковременным, и различия в резистотипах между группами с применением АБ и без них сглаживались к 6 мес корригированного возраста. Наиболее долго после приёма АБ сохранялся резистотип R2, связанный с бактериями рода *Serratia.*

B. Pérez-Viso и соавт. обнаружили ассоциацию между резистотипом дыхательных путей пациентов с бронхоэктазами и их клиническими исходами [7]. Для анализа резистома и выявления резистотипов использовали данные метагеномного секвенирования образцов мокроты. В исследование было включено 280 человек в возрасте 59–73 лет из Великобритании (Шотландия), Греции, Сингапура, Малайзии и Италии. Резистотипы определяли с помощью биоинформатического анализа данных, который включал спектральную кластеризацию на основе расстояний Брэя–Кертиса и оценку устойчивости кластеров с помощью максимизации среднего коэффициента силуэта. Этот метод позволяет измерить различия в профилях генов устойчивости между разными образцами и группировать их в кластеры на основе схожести. Анализ профилей резистома позволил выделить 2 резистотипа (RT1 и RT2) и провести ассоциацию наблюдаемых резистотипов с исходом заболевания. RT1 был связан с более благоприятными клиническими исходами и содержал повышенное количество генов устойчивости к тетрациклинам, макролидам и β-лактамным АБ. RT2 был ассоциирован с неблагоприятными клиническими исходами и характеризовался повышенным количеством генов устойчивости к аминогликозидам, хлорамфениколу, бицикломицинам, пептидным АБ, а также повышенным количеством генов — детерминант МЛУ (табл. 4).

В образцах, относящихся к RT1, наблюдалась повышенная относительная представленность бактерий видов *H. influenzae* и *R. mucilaginosa*, а также нескольких видов рода *Streptococcus*. В образцах, относящихся к резистотипу RT2, наблюдалась повышенная представленность патогенов *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae.* Успешная эрадикация *P. aeruginosa* у пациентов приводила к переходу от RT2 к RT1, что сопровождалось снижением разнообразия генов устойчивости и улучшением клинических показателей. Исследование подчеркивает важность анализа резистома для предсказания клинических исходов у пациентов с бронхоэктазами. Авторы работы полагают, что идентификация RT1 и RT2 открывает новые возможности для таргетной терапии и улучшения клинического исхода заболевания.

A.C. Anderson и соавт. описали особенности резистома биоплёнок ротовой полости у здоровых пациентов, а также пациентов с кариесом и пародонтитом [18]. В этой работе использовались метагеномные данные, полученные из образцов 179 человек. С использованием иерархической кластеризации на матрице различий Жаккара были выявлены 3 резистотипа. Резистотип 1 характеризовался высокой представленностью генов *mefA, msrD, ermB* и *blaCSP(1)* и низкой представленностью генов *pgpB, tet32* и *tetQ*. В резистотипе 2 были высоко представлены гены *ermF*, *tet32* и *tetQ* и низко представлены гены *ermB* и *blaCSP(1)*. Резистотип 3 отличался высокой представленностью генов *pgpB* и низкой представленностью генов *mefA, msrD, ermF* и *ermB*. Резистотип 3 присутствовал только в образцах пациентов с пародонтитом, в то время как резистотипы 1 и 2 присутствовали во всех группах, но в наибольшей степени — в группах здоровых пациентов и пациентов с кариесом (табл. 4).

Единственное на данный момент исследование, описывающее резистотипы микробиоты сельскохозяйственных животных, посвящено анализу резистома микробиоты рубца коров и оценке связи между резистотипами и питательной ценностью молока [27]. В этом исследовании анализировали 49 образцов микробиоты рубца (начальный отдел желудка жвачных животных), собранных у коров из двух разных ферм в Китае. Исследование разделили на две части. Первая часть, в которую были включены образцы 33 коров, была посвящена оценке влия-

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-597

ния количества потребляемого корма на резистом и резистотипы животных. Во второй части исследования определяли содержание белка в молоке коров в зависимости от резистома микробиоты рубца. В неё были включены 16 животных с высоким и низким содержанием белка в молоке. Гены АБР выявляли с использованием полногеномного метагеномного секвенирования, биоинформатическую обработку данных проводили с использованием базы CARD. Резистотипы выявляли с использованием кластеризации с применением алгоритма разделения вокруг медоида. В ходе исследования выделены 4 резистотипа, ассоциированные с выработкой молочного белка. Микробиота рубца коров с низким уровнем молочного белка была отнесена к одному резистотипу и характеризовалась высоким содержанием генов АБР. Наиболее представлены в этой группе были ген *mfd*, детерминирующий устойчивость к фторхинолонам, и ген *sav1866*, связанный с МЛУ. Связи между резистомом и потреблением различного количества корма в исследовании не установлено. Авторы делают вывод, что микробиом рубца коров и связанные с ним профили устойчивости к АБ могут оказывать влияние на качество производимой молочной продукции.

Обсуждение

Понятие резистотипа представляет собой новую характеристику бактериальных сообществ, отличную от их таксономического состава. В отличие от традиционных подходов, которые фокусируются на отдельных генах резистентности или фенотипических проявлениях устойчивости, анализ резистотипов позволяет рассматривать устойчивость на более комплексном уровне, объединяя различные гены и их взаимодействия в рамках микробных популяций или целого микробного сообщества.

С нашей стороны это не первое обращение к теме определения роли резистома в микробных сообществах. Будучи первой научной группой в России, описавшей особенности микробиоты кишечника жителей нашей страны (здоровых добровольцев) [35], мы также предложили инструмент для анализа резистома [36] и соотнесли данные резистома микробиоты кишечника россиян с имеющимися на тот момент представлениями о феномене резистома микробных сообществ [37].

Сегодня мы обращаемся к теме резистотипов как к независимой от таксономии характеристике микробиома, базируясь на собственном опыте обнаружения двух резистотипов микробиоты кишечника у пациентов, госпитализированных с COVID-19. Два обнаруженных нами резистотипа различались по количеству генов АБР, при этом у половины пациентов произошла смена резистотипа в ходе терапии. Стоит отметить, что для микробиоты орофарингеального тракта этих же пациентов мы наблюдали единственный резистотип, характеризующийся генами устойчивости к макролидам, фторхинолонам и линкозамиду [37].

В исследованиях, посвящённых резистотипам, применяют различную методологическую базу для их идентификации и характеристики. Исследования, посвящённые определению резистотипов отдельных видов бактерий, как правило, базируются на фенотипической характеристике чувствительности этих микроорганизмов к различным АБ и только изредка используют генетическое тестирование. Анализ резистотипов микробных сообществ, таких как микробиом кишечника человека, реализуется через полногеномное метагеномное секвенирование, которое позволяет выявить большинство генов АБР в резистоме, включая те, которые находятся в некультивируемых организмах. Этот метод позволяет получать детальную информацию о генетическом составе микробных сообществ и выявлять специфические кластеры генов АБР, которые формируют резистотипы. Таким образом, сегодня в научной печати параллельно встречаются разные интерпретации понятия «резистотип» в зависимости от объекта исследования и способа его характеристики. В случае изучения отдельных видов микроорганизмов резистотипом обозначают некий уникальный профиль фенотипической чувствительности, тогда как в случае метагеномного анализа микробных сообществ резистотипом называют результат кластеризации выявленных генов АБР и подбора оптимального количества кластеров.

Значение резистотипа как независимой характеристики микробного сообщества нам только предстоит осознать. В клинической практике определение резистотипов в будущем сможет играть роль в подборе рациональной антимикробной терапии. Знание о наличии конкретного резистотипа в микробиоте пациента позволит врачам выбирать наиболее эффективные сочетания АБ-препаратов, минимизируя риск развития АБР. Таким образом, резистотипирование может существенно ускорить и улучшить процесс принятия решений при лечении инфекционных заболеваний.

В сельскохозяйственной сфере основная цель изучения резистотипов заключается в выявлении спектра устойчивости микроорганизмов, патогенных для животных. Это особенно актуально для определения рисков передачи генов устойчивости от животных к человеку через пищевую цепочку. Например, выявление резистотипов у таких патогенов, как *R. equi* у лошадей или *Enterococcus* spp. у птиц, помогает оценить возможные последствия для здоровья как самих животных, так и людей, контактирующих с этими животными, а также разработать эффективные методы контроля за распространением этих патогенов.

Понимание особенностей резистотипов микробиоты животных может способствовать улучшению показателей сельскохозяйственного производства. Так, в исследовании связи резистотипов микробиоты рубца жвачных животных с качеством молочной продукции было показано, что определённые резистотипы могут быть ассоциированы с содержанием белка в молоке. Таким образом, мониторинг и контроль за резистотипами могут быть использованы для повышения эффективности производства и обеспечения безопасности сельскохозяйственной продукции.

Заключение

Резистотипы представляют собой новую характеристику бактериальных сообществ, рассматриваемую отдельно от таксономического состава. Выявление резистотипов позволяет дать дополнительную оценку резистома в различных популяциях микроорганизмов. В формировании резистотипов микробиоты отдельных людей могут играть роль различные факторы: клинические, культурные, географические и др., что подчёркивает необходимость учёта региональных особенностей при разработке стратегий по борьбе с АБР. Определение резистотипов имеет перспективы как в клинической практике, где это может способствовать выбору наиболее подходящего метода терапии, так и в сельском хозяйстве, где этот подход может быть использован для улучшения контроля за АБР микроорганизмов, патогенных для животных.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. O'Connor L., Heyderman R. The challenges of defining the human nasopharyngeal resistome. *Trends Microbiol*. 2023;31(8):816–31. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.02.008
2. Mac Aogáin M., Ivan F.X., Jaggi T.K., et al. Airway "resistotypes" and clinical outcomes in bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2024;210(1):47–62. DOI: https://doi.org/10.1164/rccm.202306-1059oc
3. Ghosh T.S., Gupta S.S., Nair G.B., Mande S.S. In silico analysis of antibiotic resistance genes in the gut microflora of individuals from diverse geographies and age-groups. *PLoS One*. 2013; 8(12):e83823. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083823
4. Lee K., Raguideau S., Sirén K., et al. Population-level impacts of antibiotic usage on the human gut microbiome. *Nat. Commun*. 2023;14(1):1191. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-023-36633-7
5. Johannessen H., Anthonisen I.L., Zecic N., et al. Characterization and fitness cost of Tn7100, a novel integrative and conjugative element conferring multidrug resistance in haemophilus influenzae. *Front. Microbiol*. 2022;13:945411. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.945411
6. Cawez F., Mercuri P.S., Morales-Yãnez F.J., et al. Development of nanobodies as theranostic agents against CMY-2-like class C β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2023;67(4): e0149922. DOI: https://doi.org/10.1128/aac.01499-22
7. Pérez-Viso B., Hernández-García M., Rodríguez C.M., et al. A long-term survey of *Serratia* spp. bloodstream infections revealed an increase of antimicrobial resistance involving adult population. *Microbiol. Spectr*. 2024;12(2):e0276223. DOI: https://doi.org/10.1128/spectrum.02762-23
8. Moore J.E., McCaughan J., Rendall J.C., Millar B.C. Case report: the conundrum of what to pick? Antibiotic susceptibility variability in *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: implications for antibiotic susceptibility testing and treatment. *Br. J. Biomed. Sci*. 2024;81:12749. DOI: https://doi.org/10.3389/bjbs.2024.12749
9. Gajdács M., Baráth Z., Kárpáti K., et al. no correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa: results from a laboratory-based in vitro study. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(9):1134. DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics10091134
10. Çöl A., Dedeić-Ljubović A., Salimović-Bešić I., Hukic M. Antibiotic resistance profiles and genetic similarities within a new generation of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus–A. baumannii* complex resistotypes in Bosnia and Herzegovina. *Microb. Drug Resist*. 2016;22(8):655–61. DOI: https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0257
11. Granov D., Dedeić-Ljubović A., Salimović-Bešić I. Characterization of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Clinical Center University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. *Microb. Drug Resist*. 2020;26(9):1038–45. DOI: https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0188
12. Jakovac S., Goić-Barišić I., Pirija M., et al. Molecular characterization and survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Mostar, Bosnia and Herzegovina. *Microb. Drug Resist*. 2021;27(3):383–90. DOI: https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0163
13. Gajdács M., Urbán E. A 10-year single-center experience on *Stenotrophomonas maltophilia* resistotyping in Szeged, Hungary. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. 2020;10(2):91–7. DOI: https://doi.org/10.1556/1886.2020.00006
14. Phoon H.Y.P., Hussin H., Hussain B.M., et al. Distribution, genetic diversity and antimicrobial resistance of clinically important bacteria from the environment of a tertiary hospital in Malaysia. *J. Glob. Antimicrob Resist*. 2018;14:132–40. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.022
15. Mohamed E.R., Aly S.A., Halby H.M., et al. Epidemiological typing of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae, which causes paediatric ventilator-associated pneumonia in Egypt. *J. Med. Microbiol*. 2017;66(5):628–34. DOI: https://doi.org/10.1099/jmm.0.000473
16. Shokri D., Rabbani Khorasgani M., Fatemi S.M., Soleimani-Delfan A. Resistotyping, phenotyping and genotyping of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) among Gram-negative bacilli from Iranian patients. *J. Med. Microbiol*. 2017;66(4):402–11. DOI: https://doi.org/10.1099/jmm.0.000444
17. Dhariwal A., Rajar P., Salvadori G., et al. Prolonged hospitalization signature and early antibiotic effects on the nasopharyngeal resistome in preterm infants. *Nat. Commun*. 2024;15(1): 6024. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-024-50433-7
18. Anderson A.C., von Ohle C., Frese C., et al. The oral microbiota is a reservoir for antimicrobial resistance: resistome and phenotypic resistance characteristics of oral biofilm in health, caries, and periodontitis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. 2023;22(1):37. DOI: https://doi.org/10.1186/s12941-023-00585-z
19. Ruppé E., Ghozlane A., Tap J., et al. Prediction of the intestinal resistome by a three-dimensional structure-based method. *Nat. Microbiol*. 2019;4(1):112–23. DOI: https://doi.org/10.1038/s41564-018-0292-6
20. Chhabra S., Khurana S., Kapoor P., et al. Resistotypes of *Rhodococcus equi* isolated from foals with respiratory problems. *J. Exp. Biol.* 2016;4(3S):242–8. DOI: https://doi.org/10.18006/2016.4(3S).242.248
21. Velhner M., Prunić B., Aleksić N., et al. antimicrobial resistance of enterococcus isolates from poultry farms in the Republic of

Serbia (Autonomous province of Vojvodina). *Microorganisms*. 2024;12(7):1483. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms12071483
22. Khumalo J., Saidi B., Mbanga J. Evolution of antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* (1972–2005). *Onderstepoort J. Vet. Res*. 2014;81(1):e1–6. DOI: https://doi.org/10.4102/ojvr.v81i1.807
23. Manfreda G., Parisi A., De Cesare A., et al. Typing of *Campylobacter jejuni* isolated from Turkey by genotypic methods, antimicrobial susceptibility, and virulence gene patterns: a retrospective study. *Foodborne Pathog. Dis*. 2016;13(2):93–100. DOI: https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2048
24. Alvarez J., Lopez G., Muellner P., et al. Identifying emerging trends in antimicrobial resistance using Salmonella surveillance data in poultry in Spain. *Transbound. Emerg. Dis*. 2020;67(1):250–62. DOI: https://doi.org/10.1111/tbed.13346
25. Cid D., Fernández-Garayzábal J.F., Pinto C., et al. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and pigs in Spain – short communication. *Acta Vet. Hung*. 2019;67(4):489–98. DOI: https://doi.org/10.1556/004.2019.048
26. Xue M.Y., Xie Y.Y., Zhong Y.F., et al. Ruminal resistome of dairy cattle is individualized and the resistotypes are associated with milking traits. *Anim. Microbiome*. 2021;3(1):18. DOI: https://doi.org/10.1186/s42523-021-00081-9
27. Chen Y., Zhou J., Wang L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease. *Front. Cell Infect. Microbiol*. 2021;11:625913. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625913
28. Vich Vila A., Collij V., Sanna S., et al. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nat. Commun*. 2020;11(1):362. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z
29. Panda S., El khader I., Casellas F., et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One*. 2014;9(4):e95476. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095476
30. Konstantinidis T., Tsigalou C., Karvelas A., et al. Effects of antibiotics upon the gut microbiome: a review of the literature. *Biomedicines*. 2020;8(11):502. DOI: https://doi.org/10.3390/biomedicines8110502
31. Hu Y.J., Cowling B.J. Reducing antibiotic use in livestock, China. *Bull. World Health Organ*. 2020;98(5):360–1. DOI: https://doi.org/10.2471/blt.19.243501
32. Ehrlich S.D. MetaHIT: The European Union Project on Metagenomics of the Human Intestinal Tract. In: Nelson K.E., ed. *Metagenomics of the Human Body*. New York;2011:307–16. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7089-3_15
33. Palleja A., Mikkelsen K.H., Forslund S.K., et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat. Microbiol*. 2018;3(11):1255–65. DOI: https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9
34. Tyakht A.V., Kostryukova E.S., Popenko A.S., et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat. Commun*. 2013;4:2469. DOI: https://doi.org/10.1038/ncomms3469
35. Yarygin K.S., Kovarsky B.A., Bibikova T.S., et al. ResistoMap-online visualization of human gut microbiota antibiotic resistome. *Bioinformatics*. 2017;33(14):2205–6. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx134
36. Ильина Е.Н., Олехнович Е.И., Павленко А.В. Резистом микробиоты кишечника как источник формирования лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний человека. *Патогенез*. 2017;15(3):20–32. Ilyina E.N., Olekhnovich E.I., Pavlenko A.V. The gut microbiota resistome provides development of drug resistance in causative agents of human infectious diseases. *Pathogenesis*. 2017;15(3):20–32. DOI: https://doi.org/10.25557/GM.2017.3.8494 EDN: https://elibrary.ru/zwohrj (in Russian)
37. Starikova E.V., Galeeva Y.S., Fedorov D.E., et al. Oropharyngeal resistome remains stable during COVID-19 therapy, while fecal resistome shifts toward a less diverse resistotype. *iScience*. 2024; 27(12):111319. DOI: https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111319

Информация об авторах

Павленко Александр Владимирович✉ — н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, pavav@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-9549-0289

Сонец Игнат Валерьевич — м. н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, ignatsonets@gmail.com, https://orcid.org/0009-0009-7266-6657

Манолов Александр Иванович — канд. биол. наук, в. н. с., зав. лаб. цифрового мониторинга здоровья человека НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, paraslonic@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3912-429X

Старикова Елизавета Валентиновна — н. с. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, e.starikova@sysbiomed.ru, https://orcid.org/0000-0001-6582-210X

Ильина Елена Николаевна — д-р биол. наук, член-корр. РАН, г. н. с., зав. лаб. математической биологии и биоинформатики НИИ системной биологии и медицины, Москва, Россия, ilinaen@sysbiomed.ru, https://orcid.org/0000-0003-0130-5079

Участие авторов: *Павленко А.В., Сонец И.В., Манолов А.И., Старикова Е.В.* — написание текста статьи; *Ильина Е.Н.* — идея статьи, общее руководство, редактирование 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 для публикации.

Статья поступила в редакцию 24.10.2024;
принята к публикации 28.12.2024;
опубликована 30.01.2025

Information about the authors

Alexander V. Pavlenko✉ — researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, pavav@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-9549-0289

Ignat V. Sonets — junior researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, ignatsonets@gmail.com, https://orcid.org/0009-0009-7266-6657

Aleksandr I. Manolov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of digital monitoring of human health, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, paraslonic@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3912-429X

Elizaveta V. Starikova — researcher, Laboratory of mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, e.starikova@sysbiomed.ru, https://orcid.org/0000-0001-6582-210X

Elena N. Ilina — D. Sci. (Biol.), Corresponding member of RAS, chief scientist, Head, Laboratory for mathematical biology and bioinformatics, Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia, ilinaen@sysbiomed.ru, https://orcid.org/0000-0003-0130-5079

Authors' contribution: *Pavlenko A.V., Sonets I.V., Manolov A.I., Starikova E.V.* — writing the text of the article; *Ilina E.N.* — idea of the article, general guidance, text editing, 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 24.10.2024;
accepted for publication 28.12.2024;
published 30.01.2025

ЮБИЛЕИ

50 лет инноваций в борьбе с вирусами: Центр «Вектор» Роспотребнадзора отметил полувековой юбилей

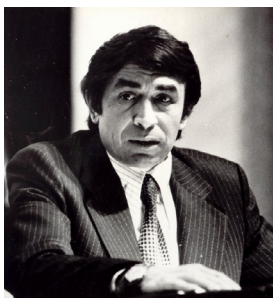
CC BY

В 1974 г. на основании Постановления Правительства СССР о развитии молекулярной биологии и биотехнологии Главное управление микробиологической промышленности при Совете министров СССР издало приказ о создании Всесоюзного научно-исследовательского института молекулярной биологии.

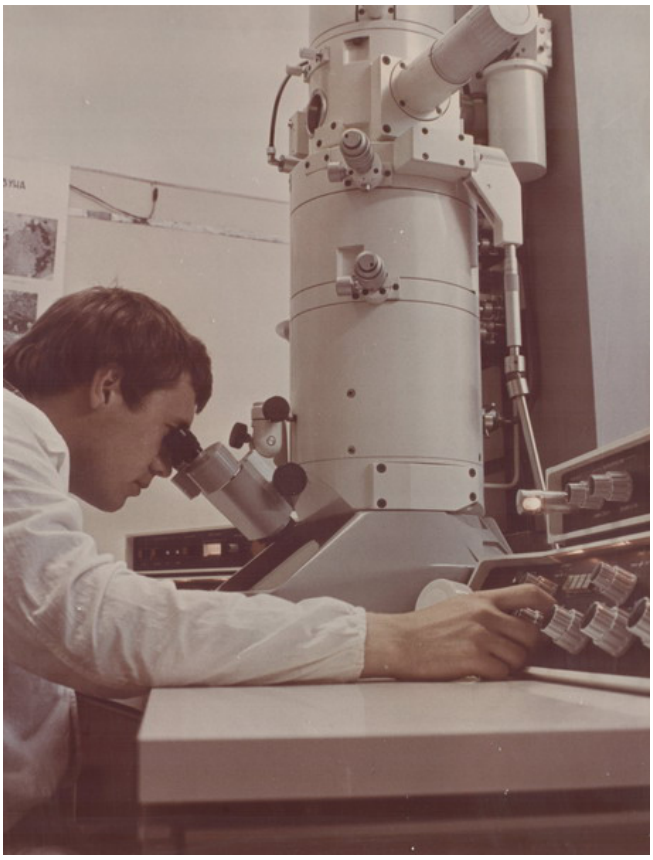
Основная задача, поставленная перед институтом в те годы, состояла в изучении фундаментальных особенностей структуры и функции опасных вирусов, а также разработке вакцинных и диагностических препаратов с использованием новейших достижений генной инженерии.

Место для строительства корпусов Института и городка молекулярных биологов было выбрано рядом с Новосибирским Академгородком. Впоследствии городок получил название Кольцово в честь всемирно известного генетика Николая Константиновича Кольцова, а в 2003 г. получил статус наукограда Российской Федерации.

В 1979 г. Институт возглавил доктор биологических наук, академик АН СССР Лев Степанович Сандахчиев. Под его руководством впервые в СССР была выделена транспортная РНК, организовано первое в России производство рекомбинантного интерферона, вакцины против гепатита А и наборов для диагностики ВИЧ-инфекции и гепатита В.



После запуска корпуса № 1 в 1984 г. начались работы с особо опасными вирусами, а уже через год ВНИИ МБ был переименован в Научно-производственное объединение «Вектор». Благодаря усилиям Льва Сандахчиева в 1994 г. «Вектору» присвоен статус Государственного научного центра Российской Федерации, который сохранён и на сегодняшний день.



С 1997 г. на базе ГНЦ ВБ «Вектор» функционирует сотрудничающий центр ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музей штаммов и ДНК вируса натуральной оспы.

В 2009 г. ГНЦ ВБ «Вектор» был присвоен статус референс-лаборатории ВОЗ по гриппу H5-подтипа, которая является единственной в Российской Федерации. В 2021 г. ГНЦ ВБ «Вектор» присвоен статус сотрудничающего центра ВОЗ по изучению вирусов гриппа в точках пересечения экосистем людей и животных.

В 2019 г. на базе «Вектора» создан «Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий».

В 2020 г. ГНЦ ВБ «Вектор» назначен Всемирной организацией здравоохранения в качестве референс-лаборатории ВОЗ, обеспечивающей подтверждающее тестирование на COVID-19, экспертную оценку общей ситуации, подходов и методов противодействия пандемии COVID-19, а в 2024 г. стал Референс-лабораторией сети ВОЗ по коронавирусам (CoViNet).

В 2020 г. в кратчайшие сроки «Вектор» разработал и зарегистрировал первые в России ПЦР-наборы для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, обеспечил их выпуск и оснащение ими диагностических лабораторий всех субъектов Российской Федерации.

В настоящее время ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора продолжает успешно выполнять одну из своих наиболее важных задач: мониторинг опасных вирусных инфекций, обеспечение своевременного реагирования и недопущение распространения болезней на территории Российской Федерации.

Редакционная коллегия и редакция «Журнала микробиологии, эпидемиологии иммунобиологии» поздравляет коллектив ГНЦ ВБ «Вектор» с юбилеем и желает продуктивной творческой работы на благо нашей Родины.