

3

МАЙ—ИЮНЬ

Том 102
2025

Ж
М
Э
И

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

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

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY

3

MAY—JUNE

VOLUME 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 K1 как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

3

МАЙ – ИЮНЬ

**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.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://proemp.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 28.06.2025.
Формат 60×90¹/₁₆. Тираж 158 экз.
Усл.-печ. л. 17,5.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., 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. Иванова 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., акад. 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

Иностранные члены редакционной коллегии

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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., акад. 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., акад. 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

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

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

Файзулов Е.Б., к.б.н., Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

16+

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2025

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

JOURNAL of MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

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

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

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

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

1.5.10. Virology (medical and biological sciences);

1.5.11. Microbiology (medical and biological sciences);

3.2.2. Epidemiology (medical and biological sciences);

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

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

3

MAY – JUNE

VOLUME 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://npoepr.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 June 28, 2025.

Print format 60×90^{1/8}.

Circulation 158 copies.

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

Deputy Editors

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

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

Executive Secretary

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

EDITORIAL BOARD

Russian members of the Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Karen K. Kyuregyan, D. Sci. (Biology), Professor, 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), Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

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

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Full 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 Full 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 Institutes of Health, Bethesda, USA

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

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

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

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

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), I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Evdeny B. Faizuloev, Cand. Sci. (Biology), Head, Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Акимкин В.Г., Балахонов С.В., Логвин Ф.В., Рязанова А.Г., Герасименко Д.К., Локтионова М.Н., Чеканова Т.А., Дугаржапова З.Ф., Никитина А.В., Олейникова К.А., Печковский Г.А., Мезенцев В.М., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Еременко Е.И., Головинская Т.М., Ладный В.И., Петремгвдлишвили К., Кравец Е.В., Васильев В.В., Ивачева М.А.**
Актуализация данных о сибиреязвенных стационарно неблагополучных пунктах и почвенных очагах как основа совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга сибирской язвы в Российской Федерации*271
- Станковцева Е.В., Оглодин Е.Г., Вержуцкий Д.Б., Червякова Н.С., Нарышкина Е.А., Федоров А.В., Ерошенко Г.А., Балахонов С.В., Кутырев В.В.**
Филогения штаммов *Yersinia pestis* линии 4.ant из Тувинского горного и сопредельных очагов чумы*284
- Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Степанова Е.А., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.**
Стабильность вакцинных штаммов сезонной живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK*296
- Ильинских Е.Н., Карпова М.Р., Воронкова О.В., Решетова А.В., Филатова Е.Н., Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Беличенко К.Р., Терновой В.А., Локтев В.Б.**
Встречаемость и генотипирование возбудителей клещевых инфекций в иксодовых клещах на востоке Западной Сибири (Россия, 2023 г.)*310
- Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Зверев В.В., Воропаев А.Д., Афанасьев М.С., Воропаева Е.А., Буданова Е.В., Смирнова Л.М., Анисова С.А., Урбан Ю.Н.**
Сочетанное действие гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11* при формировании резистентности *Candida albicans* к триазоловым противогрибковым препаратам*325
- Sutriyawan A., Rahardjo M., Martini M., Sutningsih D., Rattanapan C., Kassim N.F.A.**
Global forecasting models for dengue outbreaks in endemic regions: a systematic review331
- Огарков О.Б., Синьков В.В., Кухтина Т.А., Жданова С.Н., Кондратов И.Г.**
Полногеномное секвенирование двух клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с фенотипической чувствительностью к рифампицину при прогнозируемой Xpert MTB/RIF устойчивости*343
- Зиняков Н.Г., Грехнева А.Д., Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А., Козлов А.А., Никонова З.Б., Жестков П.Д., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.**
Изучение патогенного потенциала и возможности межвидового перехода вирусов гриппа птиц подтипа H5, выявленных на территории России в 2018–2022 годах*350

НАУКА И ПРАКТИКА

- Храмов М.В., Домотенко Л.В., Полосенко О.В., Мицевич И.П.**
Усовершенствование бактериологического метода при выделении *Listeria monocytogenes**362

ОБЗОРЫ

- Кузнецова Т.А., Галкина И.В., Крыжановский С.П., Щелканов М.Ю.**
Органные (3D-клеточные) культуры в системе эпидемиологического надзора за вирусными инфекциями*370

ЮБИЛЕИ

- К 60-летию академика РАН Василия Геннадьевича Акимкина381
- К 100-летию Натальи Николаевны Костюковой383

НЕКРОЛОГИ

- Памяти Виталия Александровича Романова384

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

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Popova A.Yu., Kulichenko A.N., Akimkin V.G., Balakhonov S.V., Logvin F.V., Ryazanova A.G., Gerasimenko D.K., Loktionova M.N., Chekanova T.A., Dugarzhapova Z.F., Nikitina A.V., Oleynikova K.A., Pechkovskii G.A., Mezentsev V.M., Semenova O.V., Aksenova L.Yu., Eremenko E.I., Golovinskaya T.M., Ladnyi V.I., Petremgvdlishvili K., Kravets E.V., Vasiliev V.V., Ivacheva M.A.**
Data update on anthrax stationary hazardous areas and soil foci as a basis for improving epizootological and epidemiological monitoring for anthrax in the Russian Federation* 271
- Stankovtseva E.V., Oglodin E.G., Verzhutsky D.B., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Fedorov A.V., Eroshenko G.A., Balakhonov S.V., Kutyrev V.V.**
Phylogeny of *Yersinia pestis* strains of the 4.ANT lineage from the Tuva mountains and adjacent plague foci* 284
- Matyushenko V.A., Kostromitina A.D., Stepanova E.A., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N.**
Stability of vaccine strains of seasonal live attenuated influenza vaccines when adapted to MDCK cell culture* 296
- Ilyinskikh E.N., Karpova M.R., Voronkova O.V., Reshetova A.V., Filatova E.N., Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Belichenko K.R., Ternovoi V.A., Loktev V.B.**
Surveillance and genotyping of tick-borne pathogens in ixodid ticks in the east of Western Siberia (Russia, 2023)* 310
- Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Zverev V.V., Voropaev A.D., Afanasiev M.S., Voropaeva E.A., Budanova E.V., Smirnova L.M., Anisova S.A., Urban Yu.N.**
The combined action of *ERG11* gene overexpression and its mutations in the development of *Candida albicans* resistance to triazolic antifungals* 325
- Sutriyawan A., Rahardjo M., Martini M., Sutningsih D., Rattanapan C., Kassim N.F.A.**
Global forecasting models for dengue outbreaks in endemic regions: a systematic review 331
- Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Kuhtina T.A., Zhdanova S.N., Kondratov I.G.**
Whole-genome sequencing of two clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility to rifampicin but predicted resistance by Xpert MTB/RIF* 343
- Zinyakov N.G., Grekhneva A.D., Andriyasov A.V., Ovchinnikova E.V., Guseva N.A., Kozlov A.A., Nikonova Z.B., Zhestkov P.D., Andreychuk D.B., Chvala I.A.**
Investigation of the pathogenic potential and the possibility of cross-species transmission of H5 avian influenza viruses detected on the territory of the Russian Federation* 350

SCIENCE AND PRACTICE

- Khramov M.V., Domotenko L.V., Polosenko O.V., Mitsevich I.P.**
Improvement of the bacteriological method for isolation of *Listeria monocytogenes** 362

REVIEWS

- Kuznetsova T.A., Galkina I.V., Krizshanovsky S.P., Shchelkanov M.Yu.**
Organoid (3D-cell) cultures in the assessment of cross-species virus transmission* 370

ANNIVERSARIES

- To the 60th anniversary of Academician of the Russian Academy of Sciences Vasily Gennad'evich Akimkin 381
- To the 100th anniversary of Professor Natalia Nikolaevna Kostyukova 383

OBITUARIES

- In memory of Vitaly Aleksandrovich Romanov 384

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оригинальное исследование

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-692>



Актуализация данных о сибиреязвенных стационарно неблагополучных пунктах и почвенных очагах как основа совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга сибирской язвы в Российской Федерации

Попова А.Ю.¹, Куличенко А.Н.², Акимкин В.Г.³, Балахонов С.В.⁴, Логвин Ф.В.⁵, Рязанова А.Г.², Герасименко Д.К.², Локтионова М.Н.³, Чеканова Т.А.³, Дугаржапова З.Ф.⁴, Никитина А.В.², Олейникова К.А.², Печковский Г.А.², Мезенцев В.М.², Семенова О.В.², Аксенова Л.Ю.², Еременко Е.И.², Головинская Т.М.², Ладный В.И.³, Петремгвдлишвили К.³, Кравец Е.В.⁴, Васильев В.В.⁴, Ивачева М.А.⁴

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

²Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

³Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

⁴Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Россия;

⁵Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Введение. Сибирская язва в Российской Федерации регистрируется ежегодно. Сохранение постоянного риска осложнения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве обусловлено повсеместным распространением почвенных очагов инфекции (сибиреязвенных захоронений (СЯЗ), «морových полей») и связанных с ними стационарно неблагополучных пунктов (СНП).

Цель работы — актуализация данных о сибиреязвенных СНП и почвенных очагах с целью совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического надзора за сибирской язвой в России.

Материалы и методы. Использованы архивные, справочные материалы о сибиреязвенных СНП и почвенных очагах, учётные и отчётные данные территориальных органов Роспотребнадзора и ветеринарной службы. Осуществлён подбор критериев характеристики сибиреязвенных СНП, СЯЗ и «морových полей», с использованием которых разработана структура баз данных СНП и почвенных очагов сибирской язвы.

Результаты. Впервые разработаны электронные базы данных сибиреязвенных СНП и почвенных очагов на территории России, содержащие актуализированную информацию о характеристиках 32 566 СНП и 3314 почвенных очагов (3185 СЯЗ и 129 «морových полей»). Анализ данных выявил снижение числа СНП и СЯЗ на территории страны по сравнению со справочными сведениями, а также отсутствие корреляции между учтённым количеством СНП и СЯЗ в большинстве регионов, что указывает на наличие большого числа неучтённых СЯЗ и сохранение потенциальных рисков осложнения ситуации по инфекции.

Заключение. Внедрение в практику органов и учреждений Роспотребнадзора, ветеринарной службы актуальных баз данных сибиреязвенных СНП и почвенных очагов позволит повысить уровень информационного обеспечения и эффективности эпизоотолого-эпидемиологического надзора за сибирской язвой в России.

Ключевые слова: сибирская язва, стационарно неблагополучный по сибирской язве пункт, почвенный очаг, сибиреязвенное захоронение, «моровое поле», эпизоотолого-эпидемиологический мониторинг

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: Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Акимкин В.Г., Балахонов С.В., Логвин Ф.В., Рязанова А.Г., Герасименко Д.К., Локтионова М.Н., Чеканова Т.А., Дугаржапова З.Ф., Никитина А.В., Олейникова К.А., Печковский Г.А., Мезенцев В.М., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Еременко Е.И., Головинская Т.М., Ладный В.И., Петремгвдлишвили К., Кравец Е.В., Васильев В.В., Ивачева М.А. Актуализация данных о сибиреязвенных стационарно неблагополучных пунктах и почвенных очагах как основа совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга сибирской язвы в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):271–283

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-692>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-692>

Data update on anthrax stationary hazardous areas and soil foci as a basis for improving epizootological and epidemiological monitoring for anthrax in the Russian Federation

Anna Yu. Popova¹, Alexander N. Kulichenko^{2✉}, Vasily G. Akimkin³, Sergey V. Balakhonov⁴, Fedor V. Logvin⁵, Alla G. Ryazanova², Diana K. Gerasimenko², Marina N. Loktionova³, Tatiana A. Chekanova³, Zorigma F. Dugarzhapova⁴, Anna V. Nikitina², Kseniya A. Oleynikova², Grigorii A. Pechkovskii², Vladimir M. Mezentshev², Olga V. Semenova², Lyudmila Yu. Aksenova², Evgeny I. Eremenko², Tatiana M. Golovinskaya², Viktor I. Ladnyi³, Ketevan Petremgvdlishvili³, Elena V. Kravets⁴, Valery V. Vasiliev⁴, Maria A. Ivacheva⁴

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia;

²Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia;

³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

⁴Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russia;

⁵Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Introduction. Anthrax is registered annually in the Russian Federation. The constant risk of complication of the epizootological and epidemiological situation on anthrax is due to the widespread distribution of soil foci of infection (anthrax burials (AB), «pestilence fields») and associated stationary hazardous areas (SHA).

The aim is to update data on anthrax SHA and soil foci in order to improve epidemiological surveillance of anthrax in the Russian Federation.

Materials and methods. Archival and reference materials on anthrax SHA and soil foci, accounting and reporting data of territorial bodies of Rospotrebnadzor and veterinary service were used.

The selection of criteria for characterizing anthrax SHA, AB and «pestilence fields» was carried out, using which the structure of databases of anthrax SHA and soil foci was developed.

Results. For the first time, electronic databases of anthrax SHA and soil foci on the territory of Russia were developed, containing updated information of the characteristics of 32566 SHA and 3314 soil foci (3185 AB and 129 «pestilence fields»). Analysis of the data revealed a decrease in the number of SHA and AB in the country compared to the reference data, as well as a lack of correlation between the counted number of SHA and AB in most regions, indicating the presence of a large number of unreported AB and the persistence of potential risks of infection situation complications.

Conclusion. The introduction of up-to-date databases of anthrax SHA and soil foci into the practice of Rospotrebnadzor bodies and institutions and veterinary services will improve the level of information support and efficiency of epidemiological surveillance of anthrax in the Russian Federation.

Keywords: anthrax, stationary hazardous area, soil focus, anthrax burial, «pestilence field», epizootological and epidemiological monitoring.

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: Popova A.Yu., Kulichenko A.N., Akimkin V.G., Balakhonov S.V., Logvin F.V., Ryazanova A.G., Gerasimenko D.K., Loktionova M.N., Chekanova T.A., Dugarzhapova Z.F., Nikitina A.V., Oleynikova K.A., Pechkovskii G.A., Mezentshev V.M., Semenova O.V., Aksenova L.Yu., Eremenko E.I., Golovinskaya T.M., Ladnyi V.I., Petremgvdlishvili K., Kravets E.V., Vasiliev V.V., Ivacheva M.A. Data update on anthrax stationary hazardous areas and soil foci as a basis for improving epizootological and epidemiological monitoring for anthrax in the Russian Federation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):271–283.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-692>

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

Введение

Сибирская язва (СЯ) — особо опасная зооантропонозная инфекционная болезнь, характеризующаяся в Российской Федерации практически повсеместным характером распространения [1, 2]. Сохранение эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по СЯ обусловлено существованием *Bacillus anthracis* в виде устойчивых к факторам внешней среды спор, способных к длительному пребыванию в почве и формированию многочисленных почвенных очагов — сибиреязвенных захоронений (СЯЗ), «моровых полей» (обширных по площади территорий без чётких границ, на которых в прошлом наблюдался массовый падеж животных, связанный с эпизоотиями СЯ), индикаторами которых служат стационарно неблагополучные по данной инфекции пункты (СНП) [2–4].

В России было зарегистрировано свыше 37 тыс. СНП, активных с 1900 по 2003 г. (некоторые СНП — с конца XIX в.) более 70 тыс. раз [5], и как минимум 4 тыс. СЯЗ [6–10]. Значительное число неблагополучных пунктов и почвенных очагов при неполном учёте и охвате вакцинацией сельскохозяйственных животных (СХЖ), лиц высокого риска инфицирования поддерживают в стране потенциальную угрозу осложнения обстановки по СЯ [11, 12].

Стабилизации ситуации в отношении сибиреязвенной инфекции может способствовать подход к комплексному решению задач эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга, важнейшей составляющей которого являются актуализация (пересмотр и уточнение данных) и систематизация информации о СНП и почвенных очагах в каждом субъекте Российской Федерации. Обобщение и анализ обновлённых сведений о СНП и почвенных очагах обеспечат совершенствование надзора за СЯ, повышая эффективность управленческих решений при расследовании вспышек болезни, в том числе при использовании современных геоинформационных систем в осуществлении сопряжённого корреляционного анализа особенностей активности СЯ в зависимости от влияния факторов среды (природно-географических, социальных и др.), с недопущением проявления новых случаев инфекции [1, 3, 13–16].

Цель работы — актуализация данных о сибиреязвенных СНП и почвенных очагах (СЯЗ, «моровых полях») с целью совершенствования эпидемиологического надзора за СЯ в России.

Материалы и методы

В качестве материалов исследования использованы архивные, справочные сведения о сибиреязвенных СНП («Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации», под ред. Б.Л. Черкаского, 2005 г., да-

лее — Кадастр) [5] и почвенных очагах («Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации», 2011–2013 гг., в 5 частях, далее — Перечень) [6–10], учётные и отчётные данные управлений Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) по субъектам Российской Федерации, территориальных органов ветеринарной службы.

Необходимость актуализации Кадастра [5] обусловлена изменением административного статуса большого количества СНП: переименованием и переподчинением муниципальных образований, переводом ряда СНП в состав других муниципальных образований (укрупнение и др.), ликвидацией многих поселений с получением статуса «бывший населённый пункт» и пр., а также включением данных о проявлениях активности СНП в XXI в. Важность корректировки Перечня [6–10] в субъектах России связана с ликвидацией большого количества СЯЗ, выявлением ранее неучтённых захоронений, уточнением характеристик СЯЗ: размеров СЯЗ, соответствия обустройства СЯЗ ветеринарно-санитарным правилам (ВСП) содержания, наличия административно-хозяйственной принадлежности СЯЗ, санитарно-защитной зоны (СЗЗ) СЯЗ, географических координат расположения и пр.

С целью актуализации данных о СНП и почвенных очагах СЯ в субъектах РФ осуществлён подбор расширенных критериев характеристик СНП, СЯЗ, «моровых полей», с учётом которых разработана структура региональных баз данных СНП и почвенных очагов инфекции.

Специалистами Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Иркутского противочумного института Роспотребнадзора, Ростовского государственного медицинского университета проведены систематизация и анализ сформированных региональных баз данных СНП и почвенных очагов по каждому субъекту, созданы две обобщённые электронные базы данных (ЭБД): «Стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты на территории Российской Федерации», «Почвенные очаги сибирской язвы на территории Российской Федерации».

ЭБД «Стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты на территории Российской Федерации» представляет собой книгу MS Excel и имеет следующую структуру: сводные данные о СНП на территории России и информацию о наличии и характеристиках СНП в субъектах РФ.

ЭБД СНП для каждого субъекта имеет следующую структуру:

- 1) данные о СНП в соответствии с Кадастром [5]: субъект РФ, административный район, муниципальное образование, населённый пункт;

- 2) актуализированные данные о СНП с указанием состояния СНП в настоящее время (существует, бывший/ликвидированный населённый пункт, вошёл в состав другого населённого пункта, переименован и др.): субъект РФ, административный район, муниципальное образование, населённый пункт;
- 3) сведения об активности СНП: годы проявления активности СНП;
- 4) сведения о заболеваемости животных и людей;
- 5) географические координаты расположения СНП.

ЭБД «Почвенные очаги сибирской язвы на территории Российской Федерации» — книга MS Excel, включающая обобщённую информацию о сибиреязвенных почвенных очагах (СЯЗ, «морových полях») и сведения о наличии и характеристиках почвенных очагов СЯ в субъектах России.

ЭБД почвенных очагов для каждого субъекта имеет следующую структуру:

- 1) актуализированные данные о СЯЗ («морovém поле»): субъект РФ, административный район, муниципальное образование, населённый пункт;
- 2) наличие ветеринарно-санитарной карточки СЯЗ;
- 3) годы захоронения животных (для СЯЗ), падёжа животных (для «морového поля»);
- 4) тип почвенного очага: СЯЗ (земляная яма, оборудованный скотомогильник, биотермическая яма Беккари, деревянный сруб), «морové поле»;
- 5) способ утилизации животных: не утилизирован (захоронение туш животных), сжигание (захоронение зольного остатка);
- 6) количество захороненных/павших животных по видам;
- 7) площадь СЯЗ («морového поля»);
- 8) ветеринарно-санитарное состояние СЯЗ: огорода, аншлаги, холм, ров;
- 9) нахождение СЯЗ в зоне подтопления: да/нет;
- 10) использование СЯЗ: законсервировано/используется;
- 11) административно-хозяйственная принадлежность СЯЗ: наличие землепользователя (балансодержателя);
- 12) характеристика СЗЗ СЯЗ: сведения о наличии и размере СЗЗ, хозяйственное использование нормируемой СЗЗ (в радиусе 1000 м): наличие жилой застройки, парков, рекреационных зон, животноводческих хозяйств, скотопрогонных трасс, объектов планируемого строительства, изыскания и добычи полезных ископаемых, зоны подтопления и др.;
- 13) географические координаты расположения СЯЗ («морového поля»).

На разработанные базы данных СНП и почвенных очагов в субъектах РФ получены свидетельства о государственной регистрации^{1, 2}.

Результаты

Результаты актуализации данных о сибиреязвенных СНП в субъектах Российской Федерации

ЭБД «Стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты на территории Российской Федерации» по состоянию на апрель 2025 г. содержит актуализированные сведения о характеристиках и расположении 32 566 СНП (табл. 1).

В субъектах РФ в целом актуализировано на 4795 СНП меньше по сравнению со сведениями Кадастра [5]. Количество учтённых СНП в большинстве субъектов России Центрального (ЦФО), Северо-Западного (СЗФО), Приволжского (ПФО), Уральского (УФО) федеральных округов меньше числа СНП, указанного в Кадастре [5]. Изменение количества СНП в сторону увеличения выявлено в некоторых субъектах Южного (ЮФО), Северо-Кавказского (СКФО), Сибирского (СФО) и Дальневосточного (ДФО) федеральных округов.

В 18 субъектах **ЦФО** актуализировано 7969 СНП. По сравнению с Кадастром [5] количество СНП снизилось на 2458 пунктов. Наибольшее число СНП (более 700 пунктов) учтено в Орловской (759 СНП), Воронежской (781) и Рязанской (840) областях. В 2000–2024 гг. активность проявили 35 СНП в 7 субъектах ЦФО: в Воронежской (12 СНП), Курской (10), Тамбовской (5), Белгородской (4), Тульской (2), Орловской (1) и Рязанской (1) областях. Географические координаты расположения установлены для 7810 (98%) СНП.

В **СЗФО** из 2148 СНП [5] актуализированы сведения о 1500 СНП на территории 10 из 11 субъектов, в городе федерального значения (г.ф.з.) Санкт-Петербурге СЯ не зарегистрирована. Большинство СНП учтено в Новгородской (772 СНП) и Вологодской (435) областях, наименьшее — в Ненецком автономном округе (НЯО) (16), Калининградской (3) и Мурманской (2) областях. С 2000 г. сибиреязвенная инфекция в СЗФО не проявлялась. Географические координаты известны для 98,6% СНП в СЗФО.

На территории **ЮФО** обновлена информация о 2589 СНП, размещённых во всех субъектах, за ис-

¹ База данных «Стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты на территории Российской Федерации», свидетельство о государственной регистрации от 01.08.2024 № 2024623389.

² База данных «Почвенные очаги сибирской язвы на территории Российской Федерации», свидетельство о государственной регистрации от 05.11.2024 № 2024624926.

Таблица 1. Сводные данные об актуализированных СНП в России

Федеральный округ	Количество СНП по данным Кадастра [5]	Количество СНП по актуализированным данным	Количество СНП с проявлениями активности с 2000 г.	Количество СНП с наличием сведений о заболевании животных	Количество СНП с наличием сведений о заболевании людей	Количество СНП с известными географическими координатами расположения
ЦФО	10 427	7969	35	1549	111	7810
СЗФО	2148	1500	—	63	9	1479
ЮФО	2453	2589	35	953	172	2500
СКФО	1225	1256	49	919	547	1234
ПФО	13 113	10 947	32	4001	804	10 511
УФО	2096	1945	4	187	2	1896
СФО	4766	4990	24	2942	168	3643
ДФО	1133	1370	5	466	118	1093
Всего	37 361	32 566	184	11 080	1931	30 166

ключением г.ф.з. Севастополя. Количество СНП превысило данные Кадастра [5] на 136 пунктов, что в первую очередь связано с включением в состав ЮФО Республики Крым, где учтено 211 СНП, а также с увеличением числа СНП в Волгоградской области (с 719 до 727), республиках Калмыкия (с 79 до 99) и Адыгея (с 74 до 75). Максимальное количество СНП установлено в Ростовской области — 797 пунктов. В ЮФО проявления инфекции с 2000 по 2016 г. регистрировались в 35 СНП при относительно большем их числе в Ростовской области (11 СНП, активных в 2000, 2002, 2003, 2005–2007, 2010, 2014 гг.). Географические координаты определены для большинства СНП (96,6%), в республиках Калмыкия (99 СНП) и Крым (211) — для всех пунктов.

Во всех 7 субъектах **СКФО** зафиксировано 1256 СНП, что на 31 пункт больше, чем в Кадастре [5]. Активность инфекции с 2000 г. выявлена в 49 СНП 5 регионов, в этот период СЯ не проявлялась только в Кабардино-Балкарской и Карачаево-Черкесской республиках. В Республике Дагестан учтено преобладающее в СКФО количество СНП — 516 (41%), в 23 из которых в 2000–2022 гг. СЯ была активна 25 раз. В Ставропольском крае с 361 СНП в 2001–2022 гг. в 10 пунктах зарегистрировано 10 вспышек. В целом географические координаты расположения определены для более чем 98% СНП в СКФО (в Республике Ингушетия и Кабардино-Балкарской Республике — для 100% СНП).

В **ПФО** (всего 14 субъектов) число СНП по сократилось на 2166 — актуализированы 10 947 неблагоприятных пунктов. Уменьшение количества учтённых СНП наиболее выражено в Кировской области (с 1275 до 534 СНП), Республике Башкортостан (с 1587 до 1292), Оренбургской области (с 1064 до 822), Ульяновской области (с 608 до 372). Свыше 60% всех СНП ПФО локализуется в 5 субъектах: Нижегородской области (1893), Республике Татарстан (1320), Республике Башкортостан (1292), Чу-

вашской Республике — Чувашии (1231), Саратовской области (1040). При этом в Республике Татарстан число СНП превышает сведения Кадастра [5] на 111 пунктов. С 2000 г. СЯ отмечалась в 32 СНП, среди которых максимум активности зафиксирован в 2000–2014 гг. в Республике Татарстан (12 вспышек в 10 СНП); 1–6 СНП были активны в 7 субъектах ПФО. Координаты расположения установлены для 96% СНП ПФО.

В **УФО** актуализировано 1945 СНП в 6 субъектах, что на 151 СНП меньше, чем в Кадастре [5]. Преобладающее большинство СНП отмечено в Тюменской области (952 СНП; 49%), далее следуют Свердловская (372), Курганская (317) и Челябинская (255) области. В Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО) количество СНП возросло с 8 до 29. Наименьшее число СНП отмечено в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре (ХМАО — Югре) — 20 (1%) СНП. Последние появления СЯ зафиксированы в Челябинской области (в 2009 г. — 1 СНП) и ЯНАО (в 2016 г. — 3 пункта). Географические координаты определены для 97,5% пунктов округа.

В **СФО** учтено 4990 СНП — актуальное число СНП превышает данные Кадастра [5] в общей сложности на 253 в 8 из 10 субъектов; уменьшение количества СНП зафиксировано в Республике Тыва (со 175 до 156 СНП) и Кемеровской области (со 161 до 151). Наибольшее число СНП отмечено в Алтайском крае (1363) и Омской области (1175), а самое низкое — в Республике Алтай (61). Вспышки СЯ после 2000 г. имели место в Республике Тыва (10 активных СНП; 11 вспышек), Алтайском крае (9; 9), Омской области (3; 3) и Красноярском крае (2; 3). Установлены географические координаты 73% СНП в СФО.

ДФО насчитывает 11 субъектов, среди которых проявления СЯ исторически не регистрировались только в Магаданской области и Чукотском автономном округе. Всего в ДФО по результатам

актуализации учтено 1370 СНП (1133 — по данным Кадастра [5]). Превышение числа СНП отмечено в 5 субъектах, совпадение — в 3, снижение — в 1 (Хабаровский край — с 46 до 41 СНП). Наибольшая доля СНП (более 60% пунктов) выявлена в Республике Саха (Якутия) (400 СНП) и Забайкальском крае (454). СЯ в 2002, 2007, 2008 гг. проявлялась в Забайкальском крае (2 активных СНП; 2 вспышки), Республике Бурятия (3; 4). Географические координаты известны для 80% СНП.

*Результаты актуализации данных
о сибиреязвенных почвенных очагах
в субъектах Российской Федерации*

ЭБД «Почвенные очаги сибирской язвы на территории Российской Федерации» по состоянию на апрель 2025 г. включает актуализированную информацию о 3314 сибиреязвенных почвенных очагах: 3185 СЯЗ и 129 «морозных полей» (табл. 2).

Анализ данных показал, что количество зарегистрированных СЯЗ в субъектах Российской Федерации на 930 меньше по сравнению со сведениями Перечня [6–10] за счёт уменьшения числа учтённых СЯЗ в большинстве субъектов ЦФО, ЮФО, СКФО, ПФО, УФО, ДФО. В некоторых субъектах СЗФО, СФО отмечено увеличение количества зарегистрированных СЯЗ. Имеется информация о 129 «морозных полях» в Российской Федерации.

В 13 субъектах ЦФО актуализированы 534 СЯЗ, что на 126 меньше данных Перечня [7]. Снижение числа СЯЗ в ЦФО обусловлено снятием захоронений с учёта. Так, в Воронежской области сняты с учёта все 81 СЯЗ, 50 из которых имели балансодержателей, после получения отрицательных на наличие СЯ результатов лабораторных исследо-

ваний единичных проб почвы, отобранных на территориях захоронений. Также были исключены из региональных реестров СЯЗ в Белгородской (14), Костромской (13), Курской (13), Тверской (10) областях. СЯЗ не значатся в Рязанской, Смоленской, Тамбовской и Тульской областях.

Наибольшее число учтённых СЯЗ имеется в Курской (146), Тверской (143), Белгородской (71) областях. Менее 10 СЯЗ числится в Ярославской (4), Калужской (3), Брянской (1) областях и г.ф.з. Москве (1). Количество учтённых СЯЗ в ЦФО увеличилось по сравнению с данными Перечня [7] в Московской (с 37 до 41) и Брянской (с 0 до 1) областях.

Согласно имеющимся данным, 286 (53,6%) СЯЗ содержат зольные остатки после сжигания СХЖ, павших от СЯ, в 156 (29,2%) СЯЗ захоронены трупы животных, для 92 СЯЗ сведения о характере захоронения отсутствуют. Анализ данных показал, что соответствие СЯЗ ВСП содержания отмечено для 427 (80%) СЯЗ, частичное соответствие — для 8% захоронений, несоответствие — для 12%. Однако большинство захоронений в округе (394 СЯЗ; 73,8%) не имеет хозяйственной принадлежности, из которых все 143 захоронения в Тверской, все 17 СЯЗ в Липецкой, 138 из 146 в Курской, 49 из 51 в Ивановской, 39 из 41 в Московской, 6 из 71 в Белгородской и 2 из 24 во Владимирской областях. Риск попадания в зону возможного подтопления определён для 5 захоронений: 3 в Курской и 2 в Ивановской областях. Географические координаты расположения известны для всех захоронений, за исключением 1 СЯЗ в Курской области.

Хозяйственное использование территории на удалении 1000 м от СЯЗ определено для половины захоронений (50,9%) — вблизи 149 СЯЗ имеются

Таблица 2. Основные данные об актуализированных почвенных очагах СЯ в Российской Федерации

Федеральный округ	Количество СЯЗ по данным Перечня 2011–2013 гг. [6–10]	Количество СЯЗ по актуализированным данным	Количество «морозных полей»	Способ утилизации животных		Количество СЯЗ, соответствующих/частично соответствующих ВСП содержания	Количество СЯЗ, не соответствующих ВСП содержания	Количество СЯЗ, имеющих балансодержателей/бесхозных СЯЗ	Количество СЯЗ с наличием используемых территорий в радиусе 1000 м	Количество почвенных очагов с известными географическими координатами
				количество СЯЗ с захоронением туш животных	количество СЯЗ с захоронением зольных остатков					
ЦФО	660	534	—	156	286	427 / 42	64	140 / 394	325	533
СЗФО	112	115	50	27	87	109 / 1	3	95 / 20	93	163
ЮФО	210	112	—	1	111	50 / 0	62	91 / 21	55	112
СКФО	278	238	—	26	212	84 / 20	134	4 / 234	343	112
ПФО	2197	1742	—	426	1170	1519 / 0	223	1468 / 274	470	1738
УФО	185	123	39	8	102	70 / 0	53	49 / 74	49	162
СФО	162	180	40	12	152	143 / 36	1	144 / 36	89	219
ДФО	311	141	—	10	102	28 / 30	83	21 / 120	86	128
Всего	4115	3185	129	666	2222	2430 / 129	623	2012 / 1173	1510	3167

жилая застройка и рекреационные зоны, 123 СЯЗ — животноводческие хозяйства, пастбища и пр., 53 — подтопляемая зона. СЗЗ установлена для 81 СЯЗ в Белгородской (70), Тверской (8), Ярославской (2) и Брянской (1) областях.

На территории 9 из 11 субъектов **СЗФО** зарегистрировано 115 СЯЗ, что на 3 захоронения больше, чем в Перечне [6]: число СЯЗ увеличилось с 25 до 30 в Псковской области, тогда как на 1 захоронение стало меньше в Республике Карелия и Ленинградской области. Подавляющее большинство СЯЗ округа локализуется в Вологодской (42), Псковской (30) и Архангельской (24) областях, единичные захоронения учтены в Республике Карелия (7), Новгородской (4) и Мурманской (3) областях, Республике Коми (2), Калининградской (2) и Ленинградской (1) областях. СЯЗ отсутствуют в г.ф.з. Санкт-Петербурге и НАО. Также получены сведения о 50 «моровых полях» на территории НАО, которые сформировались в 1880–1934 гг. в процессе эпизоотий СЯ.

В соответствии с представленной информацией зольные остатки захоронены в 87 (75,7%) СЯЗ, неутилизированные туши — в 27 (23,5%) СЯЗ; данные о способе захоронения неизвестны для 1 СЯЗ в Республике Карелия. Согласно имеющимся данным, 96% СЯЗ в СЗФО соответствуют или частично соответствуют ВСП содержания, не соответствуют 3 захоронения в Псковской (2) и Вологодской (1) областях. Наличие балансодержателя установлено для большинства (82,6%) объектов (95 СЯЗ), а его отсутствие — для 20 (Архангельская область — 13, Республика Карелия — 6, Вологодская область — 1). На территории с риском подтопления размещено 1 захоронение в Вологодской области. Географические координаты известны для 98,3% СЯЗ и 100% «моровых полей».

В радиусе 1000 м от 67 СЯЗ определено наличие жилой застройки, рекреационных зон, от 23 СЯЗ — животноводческих хозяйств, от 1 СЯЗ — подтопляемой зоны. СЗЗ определены лишь для 2 СЯЗ в Архангельской и Вологодской областях.

В **ЮФО** актуализировано 112 СЯЗ в 5 из 8 субъектов с наибольшим числом в Ростовской области (78), а также на территории Астраханской области (15), Республики Крым (13), Республики Калмыкия (5), Краснодарского края (1). Снятие с учёта всех 114 СЯЗ в Республике Адыгея, а также 1 СЯЗ в Республике Калмыкия определило снижение количества захоронений в ЮФО практически в 2 раза по сравнению с информацией Перечня [6], согласно которому на территории ЮФО (без учёта захоронений в Республике Крым в связи с выпуском Перечня [6] в 2011 г.) было зарегистрировано 210 СЯЗ. Отсутствие зарегистрированных СЯЗ показано также для Волгоградской области и г.ф.з. Севастополя.

Согласно представленным сведениям, практически все (99%) СЯЗ в ЮФО содержат захоронение

зольных остатков после сжигания трупов павшего скота, кроме 1 СЯЗ в Краснодарском крае с захоронением неутилизированной туши животного. Ветеринарно-санитарным нормам содержания соответствуют 50 (44,6%) СЯЗ; среди 62 СЯЗ, не соответствующих ВСП, 55 (88,7%) СЯЗ расположено в Ростовской области. Административно-хозяйственная принадлежность определена для 91 (81,3%) СЯЗ: 75 (96%) захоронений Ростовской области, 13 (100%) СЯЗ Республики Крым, 2 СЯЗ Астраханской области и 1 СЯЗ Краснодарского края. Географические координаты известны для 100% СЯЗ.

Наличие жилой застройки, парков выявлено в радиусе километровой зоны 39 СЯЗ, животноводческих хозяйств — 15 СЯЗ, подтопляемой территории — 1 СЯЗ. СЗЗ установлены у 3 СЯЗ в Астраханской области и 1 СЯЗ в Ростовской области.

В **СКФО** выявлены 238 СЯЗ в 5 субъектах из 7. В целом число СЯЗ в СКФО стало меньше на 40 захоронений, чем в Перечне [6], что связано со снятием с учёта 45 СЯЗ в Ставропольском крае (уменьшение количества с 75 до 30) и включением в региональные реестры поднадзорных объектов 5 ранее неучтённых СЯЗ: 2 — в Карачаево-Черкесской Республике (0/2), 3 — в Республике Северная Осетия — Алания (139 из 142). Количество захоронений не изменилось в Кабардино-Балкарской Республике (62) и Республике Дагестан (2). В Чеченской Республике и Республике Ингушетия СЯЗ не учтены.

Зольные остатки содержатся в 212 (89%) СЯЗ 4 субъектов. Неутилизированные туши павших от инфекции СХЖ захоронены в 24 СЯЗ Ставропольского края и 2 СЯЗ Республики Дагестан.

Соответствие СЯЗ нормативам ВСП определено для 84 (35,3%) СЯЗ — всех захоронений, расположенных в Республике Дагестан, Кабардино-Балкарской и Карачаево-Черкесской республиках, и для 18 (60%) СЯЗ Ставропольского края. Частичное соответствие установлено у 20 (8,4%) СЯЗ: 17 (12%) — в Республике Северная Осетия — Алания, 3 (10%) — в Ставропольском крае. Не соответствует ВСП 134 (56,3%) СЯЗ: подавляющее количество захоронений в Республике Северная Осетия — Алания (125 из 142; 88%) и 9 (30%) в Ставропольском крае. В СКФО насчитывается 4 СЯЗ, имеющих балансодержателей (по 2 в Республике Дагестан и Карачаево-Черкесской Республике). В зоне возможного подтопления располагаются 2 захоронения в Кабардино-Балкарской Республике. Точные географические координаты определены для 112 (47,1%) СЯЗ округа.

В радиусе 1000 м от 176 СЯЗ определена жилая застройка, от 162 — животноводческие предприятия, пастбища, от 3 — зоны подтопления. СЗЗ установлены только для 11 (4,6%) СЯЗ в Ставропольском крае (8), Республике Дагестан (2) и Карачаево-Черкесской Республике (1).

В **ПФО** в настоящее время учтены 1742 СЯЗ, локализующиеся в 12 из 14 субъектов. Число захоронений стало меньше на 455 в сравнении с данными в Перечне [10], в котором представлена информация о 2197 СЯЗ. Снижение количества обусловлено снятием с учёта 483 захоронений: 345 — в Чувашской Республике — Чувашии, 102 — в Республике Марий Эл, 33 — в Кировской области, 2 — в Пензенской, 1 — в Оренбургской. Число учтённых СЯЗ увеличилось в республиках Мордовия (на 23) и Татарстан (на 4), Удмуртской Республике (на 1).

Территориальное распределение СЯЗ представлено следующим образом: большинство СЯЗ учтено в республиках Татарстан (808) и Мордовия (250), Нижегородской области (231), Удмуртской Республике (101), Пензенской области (84), Пермском крае (79), Чувашской Республике — Чувашии (52); далее следуют Ульяновская область (39), Республика Марий Эл (37), Кировская (34), Оренбургская (24) и Самарская (3) области. В Республике Башкортостан и Саратовской области СЯЗ не зарегистрированы.

Большинство (67,1%) СЯЗ характеризуется захоронением зольных остатков, 24,5% — трупов СХЖ, для 8,4% СЯЗ информации о характере захоронения отсутствуют. Несоответствие ВСП установлено для 223 (12,8%) СЯЗ округа, 1519 (87,2%) СЯЗ соответствует правилам содержания. Значительная доля СЯЗ (84,3%) имеет административно-хозяйственную принадлежность. Бесхозными являются все 250 СЯЗ в Республике Мордовия, 11 — в Оренбургской области, 10 — в Кировской, 3 — в Самарской (всего 274 СЯЗ). В зоне риска подтопления расположены 5 захоронений в Нижегородской области и 3 в Республике Марий Эл. Географические координаты определены для 99% СЯЗ в ПФО и неизвестны для 4 захоронений (по 2 в Республике Татарстан и Пензенской области).

Хозяйственное использование прилегающих к захоронениям территорий в радиусе 1 км определено для 406 СЯЗ, подтопляемые зоны — для 43. ССЗ установлены для 69 СЯЗ, 45 из которых расположены на территории Республики Татарстан.

Актуализирована информация о наличии в пределах всех 6 субъектов **УФО** 123 захоронений, что на 62 меньше, чем в Перечне [8]. Уменьшение числа СЯЗ зафиксировано только в Тюменской области, где сняты с учёта 72 из 74 захоронений. Отмечено возрастание количества учтённых СЯЗ, в первую очередь за счёт формирования 9 СЯЗ в ЯНАО в процессе крупнейшей эпизоотии СЯ среди северных оленей в 2016 г. (увеличение числа с 0 до 9), а также постановкой на учёт 1 СЯЗ в Курганской области (увеличение числа с 20 до 21). Количество СЯЗ в остальных субъектах УФО осталось прежним: Свердловская область — 72, Челябинская область — 17, ХМАО — Югра — 2. Помимо СЯЗ,

в ЯНАО дополнительно установлено местоположение 39 «морových полей», образовавшихся с 1908 г. в процессе эпизоотий СЯ среди оленей и занимающих более 8 млн га территории ЯНАО.

Согласно имеющимся сведениям, 83% СЯЗ содержат зольные остатки, неутилизированные туши — 8 СЯЗ в Свердловской области, для 13 захоронений данные отсутствуют. Соответствие ВСП установлено для 57%, не соответствует ВСП 53 (43%) СЯЗ в Свердловской (49), Челябинской (3) и Курганской (1) областях. Значительное количество (74 из 123 СЯЗ; 60%) являются бесхозными, среди них 49 СЯЗ в Свердловской области, 16 — в Курганской области, 9 — в ЯНАО. В зоне возможного подтопления локализуется 1 СЯЗ в Свердловской области. Географические координаты известны для 100% почвенных очагов УФО.

В радиусе 1000 м от 43 СЯЗ отмечено хозяйственное использование территорий, от 5 захоронений — зона подтопления. ССЗ установлены для 14 (11,4%) СЯЗ в Курганской (6), Свердловской (6) и Челябинской (2) областях.

В 7 из 10 субъектов **СФО** учтены 180 захоронений, что на 18 превышает количество СЯЗ, указанное в Перечне [9], за счёт постановки на учёт 10 СЯЗ в Республике Тыва, 6 — в Алтайском крае, 2 — в Иркутской области. Подавляющее число (103) СЯЗ размещено в Кемеровской области, 26 — в Алтайском крае, по 15 — в Красноярском крае и Иркутской области, 11 — в Республике Тыва, 9 — в Новосибирской области. Захоронения не зарегистрированы в Республике Алтай, Омской и Томской областях. В Красноярском крае, помимо захоронений, также учтено 40 «морových полей» общей площадью свыше 4500 га, образованных в период эпизоотий среди северных оленей на Таймыре в 1904–1967 гг.

Значительная часть СЯЗ (152 СЯЗ; 84,4%) характеризуется захоронением зольных остатков, в 12 СЯЗ Красноярского края захоронены туши павших СХЖ, условия захоронения для 16 СЯЗ не установлены. Для 99% СЯЗ в округе указано полное (143) и частичное (36) соответствие ВСП и известны географические координаты, не соответствует правилам содержания 1 СЯЗ в Кемеровской области. У большинства захоронений в СФО (144 СЯЗ; 80%) имеются балансодержатели; без хозяйственной принадлежности выявлены 36 СЯЗ. В зоне подтопления расположено 1 СЯЗ в Алтайском крае.

Определено наличие жилой застройки в прилегающей километровой зоне 65 СЯЗ, животноводческих хозяйств — 20 СЯЗ, подтапливаемой территории — 4 СЯЗ. ССЗ установлены для 114 (63,3%) СЯЗ на территории Кемеровской (103), Новосибирской (8) областей и Красноярского края (3).

Известно о 141 СЯЗ, расположенном в 6 из 11 субъектов **ДФО**, что в целом на 170 СЯЗ меньше,

чем по сведениям Перечня [7], содержащего сведения о 311 СЯЗ. Изменения в количестве захоронений затронули 7 субъектов округа. По результатам пересмотра и анализа данных, ввиду отсутствия сведений о точном местоположении СЯЗ, число объектов уменьшилось на 268: в Республике Саха (Якутия) — на 239 (с 275 до 36), в Еврейской автономной области — на 19 (с 22 до 3), в Приморском крае — на 9 (с 12 до 3), в Сахалинской области — на 1 (с 1 до 0). Количество учтённых СЯЗ увеличилось в Забайкальском крае на 81 (с 0 до 81), Республике Бурятия — на 16 (с 1 до 17), Камчатском крае — на 1 (с 0 до 1). В Хабаровском крае, Амурской, Магаданской, Сахалинской областях и Чукотском автономном округе сибиреязвенные объекты отсутствуют.

Захоронения зольных остатков отмечены в 102 (72,3%) СЯЗ, трупов СХЖ — в 10, а сведения в отношении 29 СЯЗ отсутствуют. Для большинства СЯЗ (83; 59%) выявлено несоответствие ВСП содержания — преимущественно в Забайкальском крае (43) и Республике Саха (Якутия) (33), а также в Республике Бурятия (4) и Приморском крае (3). Большинство захоронений ДФО (120; 85%) — бесхозные. Наличие балансодержателя установлено только для 21 СЯЗ в 4 регионах (Республике Бурятия — 12, Забайкальском, Приморском краях и Еврейской автономной области — по 3). Два захоронения в Республике Бурятия и Еврейской автономной области расположены в местах возможного подтопления. Географические координаты известны для 128 (91%) СЯЗ, точная локализация неизвестна для 13 захоронений Республики Саха (Якутия).

В радиусе 1000 м от 71 СЯЗ выявлено наличие животноводческих предприятий, от 11 — жилой застройки, от 3 — зоны подтопления. В ДФО отсутствуют СЯЗ с установленными СЗЗ.

Обсуждение

Актуализация данных о стационарно неблагополучных по СЯ пунктах на территории России позволила получить характеристики свыше 85% СНП от числа пунктов, представленных в Кадастре [5], с информацией о географических координатах расположения 92,6% актуализированных СНП, расположенных в 81 субъекте из 85.

Уменьшение количества СНП отмечено в 51 субъекте, в 13 из них — более чем на 100 пунктов, среди которых наиболее значительная разница определена в 3 регионах (Смоленская область — снижение на 941 СНП, Кировская область — на 741, Орловская область — на 523). Снижение количества СНП обусловлено как ликвидацией ряда населённых пунктов и их слиянием с другими, так и тем обстоятельством, что СНП — это не только населённые пункты, но и животноводческие фермы, пастбища и пр., на территории которых хотя бы однократно регистрировались эпизоотии СЯ,

и невозможностью восстановления сведений о расположении этих неблагополучных в прошлом и упразднённых хозяйствах различных форм собственности.

Превышение числа СНП по сравнению с Кадастром [5] установлено в 22 субъектах с максимальным различием в республиках Саха (Якутия) (на 129) и Татарстан (на 111). В базу данных также включены сведения о неблагополучных пунктах в Республике Крым, отсутствующие в Кадастре [5]. Согласно архивным материалам, СЯ не регистрировалась за весь период наблюдения в 4 субъектах Российской Федерации: Магаданской области, Чукотском автономном округе, г.ф.з. Санкт-Петербурге и Севастополе.

В процессе актуализации получена характеристика 3185 СЯЗ, расположенных в 63 субъектах России (включая Республику Крым), и 129 «моровых полей» в 3 северных регионах (НАО, ЯНАО, Красноярский край). Географические координаты локализации определены более чем для 95% захоронений и 100% «моровых полей».

Анализ данных о СЯЗ выявил ряд проблемных вопросов. В первую очередь установлено снижение количества зарегистрированных СЯЗ на 1116 объектов, обусловленное снятием с учёта СЯЗ в 20 субъектах. Значительное снижение количества учтённых СЯЗ отмечено в 6 субъектах, среди которых Чувашская Республика — Чувашия (уменьшение на 345 СЯЗ), Республика Саха (Якутия) (на 239), Республика Марий Эл (на 102), Тюменская область (на 72), Ставропольский край (на 45), Кировская область (на 33). Сокращение числа зарегистрированных СЯЗ выявлено также в Еврейской автономной области (на 19), Белгородской области (на 14), Костромской и Курской областях (по 13), Тверской области (на 10), Приморском крае (на 9), Пензенской области (на 2), а также по 1 СЯЗ в республиках Калмыкия и Карелия, Ленинградской, Оренбургской и Сахалинской областях. Кроме того, все СЯЗ были исключены из региональных реестров в Республике Адыгея (114) и Воронежской области (81). Также известно, что ещё до издания Перечня [6, 7] были сняты с учёта все 53 СЯЗ, которые были зарегистрированы на территории 20 районов Волгоградской области [17], и все 168 захоронений в Тульской области. Исключение СЯЗ из перечней региональных реестров происходило в соответствии с постановлениями региональных правительств, управлений (комитетов, агентств) ветеринарии о ликвидации неиспользуемых скотомогильников на территории субъектов, считая, что места захоронения зольных остатков павших от СЯ животных не представляют опасности и не являются СЯЗ. Однако ретроспективное установление факта сожжения трупов сибиреязвенных животных именно до эпидемически безопасного неорганического остатка

не представляется возможным, как и в принципе сжигание туш животных, павших от СЯ, до золы с использованием подручных средств, когда, как показывает практика, на месте документально обозначенного захоронения «зольных остатков» обнаруживаются несожженные костные фрагменты СХЖ. Причиной уменьшения числа СЯЗ также стало их снятие с учёта ввиду отсутствия данных о точном расположении.

Показано, что более 36% СЯЗ не имеет административно-хозяйственной принадлежности, 20% СЯЗ не соответствуют ВСП содержания. Локализация на местности с риском подтопления определена для 20 СЯЗ, наличие зоны подтопления в пределах прилегающей территории — для 113. Выявлено хозяйственное использование земельных участков в радиусе 1000 м от ряда захоронений: наличие жилой застройки, рекреационных зон — 892 (28%) СЯЗ, животноводческих предприятий, пастбищ — 478 (15%) СЯЗ; планируются к освоению прилегающие территории 27 захоронений.

Результаты анализа данных подтвердили отсутствие корреляции между количеством СНП — маркеров наличия почвенных очагов СЯ — и числом СЯЗ. Так, на административных территориях 31 субъекта при наличии 14 884 СНП с регистрацией многократных проявлений инфекции учтено лишь 552 СЯЗ, а в 18 субъектах, имеющих 8025 СНП, в которых зарегистрировано более 21,5 тыс. вспышек СЯ, СЯЗ вовсе не значатся: Омская (1175 СНП), Саратовская (1040), Рязанская (840), Воронежская (781), Волгоградская (727), Тамбовская (699), Смоленская (572), Томская (271), Тульская (155), Амурская (114), Сахалинская (3) области, Республики Башкортостан (1292), Адыгея (75), Алтай (61), Ингушетия (21), Чеченская Республика (142), Хабаровский край (41), НАО (16), что свидетельствует о наличии в России значительного числа неучтённых СЯЗ.

Заключение

В результате масштабной систематизации информации впервые созданы базы данных СНП и почвенных очагов инфекции, содержащие актуализированную информацию о характеристиках и расположении 32 566 сибиреязвенных СНП и 3314 почвенных очагов (3185 СЯЗ и 129 «мировых полей») в Российской Федерации. Полученные данные о сибиреязвенных СНП и почвенных очагах будут служить основополагающим ресурсом повышения уровня информационного обеспечения, эффективности эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга и профилактики СЯ на территории субъектов РФ.

Анализ данных позволил оценить современные эпидемиологические риски, обусловленные почвенными очагами СЯ. Факты практически повсеместного наличия значительного количества неучтённых

СЯЗ, снятие захоронений с учёта, отсутствие достоверного местоположения учтённых СЯЗ, наличие бесхозных и не соответствующих ветеринарно-санитарным правилам содержания СЯЗ, а также существование «морских полей» в северных регионах России на фоне неполного учёта и охвата иммунизацией восприимчивых СХЖ поддерживают постоянный потенциальный риск осложнения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по СЯ.

Пути решения данных проблем состоят, в первую очередь, в реализации мероприятий, направленных на исключение устранимых (социальных) факторов риска, включающих:

- обустройство СЯЗ согласно нормативным требованиям с использованием административного ресурса;
- обеспечение регулярного надзора за ветеринарно-санитарным состоянием СЯЗ;
- установление ССЗ СЯЗ;
- недопущение снятия с учёта и ликвидации СЯЗ; восстановление в региональных реестрах СЯЗ, исключённых из перечня поднадзорных объектов, осуществление комплекса надзорных мероприятий;
- использование информации о локализации «морских полей» при планировании проведения изыскательских работ, добычи полезных ископаемых;
- принятие дополнительных мер по поголовному учёту и ежегодной вакцинации СХЖ;
- обеспечение специфической иммунизации контингентов из групп риска.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. и др. Пути совершенствования эпидемиологического надзора и контроля за сибирской язвой в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(1):84–8. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., et al. Ways to improve the epidemiological surveillance and control of anthrax in the Russian Federation. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(1):84–8. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-84-88> EDN: <https://elibrary.ru/yixypp>
2. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Фирстова В.В. *Сибирская язва вчера и сегодня*. М.;2022. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Shishkova N.A., Firsova V.V. *Anthrax Yesterday and Today*. Moscow;2021.
3. Черкасский Б.Л. *Эпидемиология и профилактика сибирской язвы*. М.;2002. Cherkasskii B.L. *Epidemiology and Prevention of Anthrax*. Moscow;2002. EDN: <https://elibrary.ru/pbdimz>
4. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Герасимов В.Н. *Сибиреязвенные скотомогильники: проблемы и решения*. М.;2017. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Shishkova N.A., Gerasimov V.N. *Anthrax Cattle Burials: Problems and Solutions*. Moscow;2017. EDN: <https://elibrary.ru/vvyzn1>
5. Черкасский Б.Л., ред. *Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации*. М.;2005. Cherkasskii B.L., ed. *Cadastre of Permanently Disadvantaged Anthrax Settlements of the Russian Federation*. Moscow;2005.

6. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Северо-Западный, Южный, Северо-Кавказский федеральные округа): информационное издание. Часть 1. М.;2011. List of animal burial grounds (including anthrax) located on the territory of the Russian Federation (North Western, Southern, North Caucasian Federal Districts): information publication. Part 1. Moscow;2011.
7. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Центральный, Дальневосточный федеральные округа): информационное издание. Часть 2. М.;2012. List of animal burial grounds (including anthrax) located on the territory of the Russian Federation (Central, Far Eastern Federal Districts): information publication. Part 2. Moscow;2012.
8. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Уральский федеральный округ): информационное издание. Часть 3. М.;2012. List of animal burial grounds (including anthrax) located on the territory of the Russian Federation (Ural Federal District): information publication. Part 3. Moscow;2012.
9. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Сибирский федеральный округ): информационное издание. Часть 4. М.;2012. List of animal burial grounds (including anthrax) located on the territory of the Russian Federation (Siberian Federal District): information publication. Part 4. Moscow;2012.
10. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации (Приволжский федеральный округ): информационное издание. Часть 5. М.;2013. List of animal burial grounds (including anthrax) located on the territory of the Russian Federation (Volga Federal District): information publication. Part 5. Moscow;2013.
11. Симонова Е.Г., Раичич С.Р., Картава С.А. и др. Проявления активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации в современных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018;(2):90–4. Simonova E.G., Raichich S.R., Kartavaya S.A., et al. Manifestation of activity of potentially hazardous as regards anthrax areas across the Russian Federation under current conditions. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2018;(2):90–4. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-90-94> EDN: <https://elibrary.ru/xrvvhf>
12. Рязанова А.Г., Скударева О.Н., Герасименко Д.К. и др. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по сибирской язве в 2023 г. в мире, прогноз на 2024 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024;(3):35–41. Ryazanova A.G., Skudareva O.N., Gerasimenko D.K., et al. Analysis of the epizootiological and epidemiological situation on anthrax in the world in 2023, the forecast for 2024 in the Russian Federation. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024;(3):35–41. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-3-35-41> EDN: <https://elibrary.ru/nvwvhe>
13. Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Рязанова А.Г. и др. Эпизоотолого-эпидемиологическая характеристика стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов в Ставропольском крае и СКФО. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(2):36–9. Buravtseva N.P., Mezentshev V.M., Ryazanova A.G., et al. Epizootiological-epidemiological characteristics of the stationary hazardous as regards anthrax areas in the Stavropol Territory and North Caucasian Federal District. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(2):36–9. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-36-39> EDN: <https://elibrary.ru/wcdosz>
14. Водяницкая С.Ю., Водопьянов А.С., Киреев Ю.Г. и др. О совершенствовании эпидемиологического надзора за сибирской язвой в Ростовской области на основе новых компьютерных технологий. *Медицинский вестник Юга России*. 2016;(2):42–6. Vodyanitskaya S.Yu., Vodopyanov A.S., Kireev Yu.G., et al. On Improvement of the Epidemiological Surveillance of Anthrax in the Rostov Region on the Basis of New Computer Technologies. *Medical Herald of the South of Russia*. 2016;(2):42–6. EDN: <https://elibrary.ru/wcaezb>
15. Симонова Е.Г., Локтионова М.Н., Картава С.А., Хадарцев О.С. Сибирская язва: оценка эпизоотолого-эпидемиологического риска на современном этапе. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013;(2):5–11. Simonova E.G., Loktionova M.N., Kartavaya S.A., Hadartsev O.S. Anthrax: epizootological and epidemiological risk assessment in the Russian Federation at the present stage. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013;(2):5–11. EDN: <https://elibrary.ru/pyuacn>
16. Шишкова Н.А., Тюрин Е.А., Маринин Л.И. и др. Современное состояние проблемы сибирской язвы. *Бактериология*. 2017;2(3):33–40. Shishkova N.A., Tyurin E.A., Marinin L.I., et al. The current state of the problem of anthrax. *Bacteriology*. 2017;2(3):33–40. EDN: <https://elibrary.ru/uqhmou>
17. Алексеев В.В., ред. *Атлас эпизоотолого-эпидемиологической географии сибирской язвы в Волгоградской области*. Волгоград; 2010. Alekseev V.V., ed. *Atlas of Epizootological and Epidemiological Geography of Anthrax in the Volgograd Region*. Volgograd; 2010. EDN: <https://elibrary.ru/wqfuab>

Информация об авторах

Попова Анна Юрьевна — д-р мед. наук, профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9032>

Куличенко Александр Николаевич[✉] — д-р мед. наук, проф., академик РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Акимкин Василий Геннадьевич — д-р мед. наук, проф., академик РАН, директор Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии, Москва, Россия, crie@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Балахонов Сергей Владимирович — д-р мед. наук, проф., директор Иркутского противочумного института, Иркутск, Россия, adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Information about the authors

Anna Yu. Popova — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2567-9032>

Alexander N. Kulichenko[✉] — Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the RAS, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Vasily G. Akimkin — Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the RAS, Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, crie@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Sergey V. Balakhonov — Dr. Sci. (Med.), Professor, Director, Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russia, adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Fedor V. Logvin — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of epidemiology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, okt@rostgmu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4410-1677>

Логвин Федор Васильевич — канд. мед. наук, доцент, зав. каф. эпидемиологии Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, Россия, okt@rostgmu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4410-1677>

Рязанова Алла Геннадьевна — канд. мед. наук, зав. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Герасименко Диана Константиновна — м. н. с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8636-6585>

Локтионова Марина Николаевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии, Москва, Россия, m.lokt@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1332-519X>

Чеканова Татьяна Александровна — канд. биол. наук, зав. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии, Москва, Россия, tcchekanova74@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2532-0054>

Дугаржапова Зоригма Федоровна — канд. мед. наук, зав. отделом эпидемиологии и микробиологии зооантропонозных инфекций Иркутского противочумного института, Иркутск, Россия, zorignmad@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5315-4797>

Никитина Анна Владимировна — м. н. с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0006-4544-7860>

Олейникова Ксения Анатольевна — м. н. с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-3479-9434>

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

Мезенцев Владимир Матвеевич — канд. мед. наук, врач-эпидемиолог, с. н. с. лаб. эпидемиологии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, snipchi@mail.stv.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0613-861X>

Семенова Ольга Викторовна — канд. биол. наук, н. с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Аксенова Людмила Юрьевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Еременко Евгений Иванович — д-р мед. наук, проф., г. н. с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, ejer@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>

Головинская Татьяна Михайловна — канд. биол. наук, н. с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6475-4512>

Ладный Виктор Иванович — н. с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии, Москва, Россия, anthraxcrie@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7525-8127>

Петремгвдлшвили Кетеван — н. с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии, Москва, Россия, ketevan0511@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8330-336X>

Кравец Елена Владимировна — канд. биол. наук, с. н. с. отдела эпидемиологии и микробиологии зооантропонозных инфекций Иркутского противочумного института, Иркутск, Россия, adm@chumn.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7194-6413>

Васильев Валерий Владимирович — канд. биол. наук, н. с. отдела эпидемиологии и микробиологии зооантропонозных инфекций Иркутского противочумного института, Иркутск, Россия, marmakeda_007@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5709-7814>

Alla G. Ryazanova — Cand. Sci. (Med.), Head, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Diana K. Gerasimenko — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8636-6585>

Marina N. Loktionova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of epidemiology of natural and focal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, m.lokt@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1332-519X>

Tatiana A. Chekanova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of epidemiology of natural and focal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, tcchekanova74@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2532-0054>

Zorigma F. Dugarzhapova — Cand. Sci. (Med.), Head, Department of epidemiology and microbiology of zoonanthropous infections, Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russia, zorignmad@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5315-4797>

Anna V. Nikitina — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0006-4544-7860>

Kseniya A. Oleynikova — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-3479-9434>

Grigori A. Pechkovskii — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, grigorii.pechkovskii@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Vladimir M. Mezentshev — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of epidemiology, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, snipchi@mail.stv.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0613-861X>

Olga V. Semenova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Lyudmila Yu. Akseanova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Evgeny I. Eremenko — Dr. Sci. (Med.), Professor, principal researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, ejer@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8163-1300>

Tatiana M. Golovinskaya — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, anthraxlab.stv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6475-4512>

Viktor I. Ladnyi — researcher, Laboratory of epidemiology of natural and focal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, anthraxcrie@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7525-8127>

Ketevan Petremgvdlishvili — researcher, Laboratory of epidemiology of natural and focal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, ketevan0511@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8330-336X>

Elena V. Kravets — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of epidemiology and microbiology of zoonanthropous infections, Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russia, adm@chumn.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7194-6413>

Valery V. Vasiliev — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of epidemiology and microbiology of zoonanthropous infections, Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russia, marmakeda_007@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5709-7814>

Maria A. Ivacheva — junior researcher, Department of epidemiology and microbiology of zoonanthropous infections, Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russia, ivacevam@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3794-5337>

Authors' contribution: *Popova A. Yu.* — research concept, approval of the final text article version; *Kulichenko A.N., Akimkin V.G., Balakhonov S.V.* — research concept, text article editing; *Ryazanova A.G., Chekanova T.A., Loktionova M.N., Dugarzhapova Z.F.* — re-

Ивачева Мария Александровна — м. н. с. отдела эпидемиологии и микробиологии зооантропонозных инфекций Иркутского противочумного института, Иркутск, Россия, ivacevam@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3794-5337>

Участие авторов: *Полова А.Ю.* — концепция исследования, утверждение финального варианта текста статьи; *Куличенко А.Н., Акимкин В.Г., Балахонов С.В.* — концепция исследования, редактирование текста статьи; *Рязанова А.Г., Чеканова Т.А., Локтионова М.Н., Дугаржапова З.Ф.* — концепция исследования, написание и редактирование текста статьи; *Герасименко Д.К., Логвин Ф.В.* — актуализация и анализ баз данных сибиреязвенных стационарно неблагополучных пунктов и почвенных очагов в субъектах Северо-Кавказского, Южного и Уральского федеральных округов, написание текста статьи; *Мезенцев В.М., Олейникова К.А., Никитина А.В., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Печковский Г.А., Головинская Т.М., Еременко Е.И.* — актуализация и анализ баз данных сибиреязвенных стационарно неблагополучных пунктов и почвенных очагов в субъектах Северо-Кавказского, Южного и Уральского федеральных округов; *Чеканова Т.А., Локтионова М.Н., Ладный В.И., Петремагдlishvili К.* — актуализация и анализ баз данных сибиреязвенных стационарно неблагополучных пунктов и почвенных очагов в субъектах Центрального, Северо-Западного и Приволжского федеральных округов; *Кравец Е.В., Васильев В.В., Ивачева М.А.* — актуализация и анализ баз данных сибиреязвенных стационарно неблагополучных пунктов и почвенных очагов в субъектах Сибирского и Дальневосточного федеральных округов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 18.04.2025;
принята к публикации 20.06.2025;
опубликована 28.06.2025

search concept, text article writing and editing; *Gerasimenko D.K., Logvin F.V.* — updating and analysis databases of anthrax stationary hazardous areas and soil foci in the subjects of the North Caucasian, Southern and Ural Federal Districts, text article writing; *Mezentsev V.M., Oleynikova K.A., Nikitina A.V., Semenova O.V., Aksenova L.Yu., Pechkovskii G.A., Golovinskaya T.M., Eremenko E.I.* — updating and analysis databases of anthrax stationary hazardous areas and soil foci in the subjects of the North Caucasian, Southern and Ural Federal Districts; *Chekanova T.A., Loktionova M.N., Ladnyi V.I., Petremagdlishvili K.* — updating and analysis databases of anthrax stationary hazardous areas and soil foci in the subjects of the Central, North Western and Volga Federal Districts; *Kravets E.V., Vasiliev V.V., Ivacheva M.A.* — updating and analysis databases of anthrax stationary hazardous areas and soil foci in the subjects of the Siberian and Far Eastern Federal Districts. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 18.04.2025;
accepted for publication 20.06.2025;
published 28.06.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-659>



Филогения штаммов *Yersinia pestis* линии 4.ANT из Тувинского горного и сопредельных очагов чумы

Станковцева Е.В.¹, Оглодин Е.Г.¹, Вержуцкий Д.Б.², Червякова Н.С.¹, Нарышкина Е.А.¹, Федоров А.В.¹, Ерошенко Г.А.¹, Балахонов С.В.², Кутырев В.В.¹

¹Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия;

²Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия

Аннотация

Введение. Тувинский горный очаг чумы (ТГОЧ) в России с момента его открытия в 1964 г. проявляет постоянную эпизоотическую активность. Штаммы *Yersinia pestis*, выделяемые в этом очаге, относятся к филогенетической линии 4.ANT античного биовара основного подвида. Они высоковирулентны и эпидемически значимы. Использование современных молекулярно-генетических технологий позволит определить популяционную структуру штаммов 4.ANT в ТГОЧ.

Цель исследования — филогенетический и популяционный анализ штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из ТГОЧ по данным полногеномного SNP-типирования (single nucleotide polymorphism) и MLVA25-типирования (multiple locus variable number tandem repeats analysis).

Материалы и методы. Использованы полногеномные нуклеотидные последовательности 68 штаммов *Y. pestis*, включая 60 штаммов линии 4.ANT. Секвенирование штаммов проводили на платформе MGI. SNP-анализ выполняли путём выравнивания последовательностей в программе «Snippy v. 4.6» с последующим построением дендрограммы Maximum Likelihood на основе выявленных коровых SNPs в программе «SeaView». SNPs, маркерные для штаммов линии 4.ANT, выявляли при помощи программы «MEGA11». MLVA-генотипирование штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT проводили путём поиска локусов с последующим подсчётом количества tandemных повторов в программе «Tandem Repeats Finder». Построение MLVA-дендрограммы выполняли методом UPGMA в программе «BioNumerics v. 7.6.3».

Результаты. По данным SNP-анализа штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из ТГОЧ установлено наличие 4 филогеографических групп: Т1 (Саглинский, Толайлыгский и Барлыкский мезоочаги, 1971–1987 гг.), Т2 (Каргинский мезоочаг, 2014–2024 гг.), Т3 (Каргинский мезоочаг, 1977–2009 гг.), Т4 (Каргинский, Толайлыгский и Боро-Шайский мезоочаги, 2006–2013 гг.). Выявлены 8 MLVA-генотипов штаммов линии 4.ANT из Тувы и вариабельные VNTR-локусы: *yp1290ms04*, *yp1935ms05*, *yp0559ms15*, *yp4042ms35*, *yp4425ms38*, *yp1108ms45*, *yp4280ms62*, *yp1580ms70*.

Обсуждение. Среди штаммов, взятых в анализ, наиболее ранними представителями ветви 4.ANT выступают штаммы кластера Т1 из ТГОЧ. Отдельными подветвями на дереве представлены популяция штаммов из Горного Алтая и Монголии и популяция штаммов из ТГОЧ (1977–2024 гг.). Последняя популяция представлена политомией и характеризуется выраженной кластеризацией по пространственно-временному принципу.

Заключение. Определено наличие 4 основных филогеографических групп в популяции 4.ANT в ТГОЧ и установлены генетические различия между ними, что может быть использовано для углублённой молекулярно-генетической дифференциации и типирования штаммов *Y. pestis* в этом очаге.

Ключевые слова: чума, *Yersinia pestis*, Тувинский горный очаг, SNP-анализ, MLVA-типирование

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: Станковцева Е.В., Оглодин Е.Г., Вержуцкий Д.Б., Червякова Н.С., Нарышкина Е.А., Федоров А.В., Ерошенко Г.А., Балахонов С.В., Кутырев В.В. Филогения штаммов *Yersinia pestis* линии 4.ant из Тувинского горного и сопредельных очагов чумы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):284–295.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-659>

EDN: <https://www.elibrary.ru/SCLR1W>

Phylogeny of *Yersinia pestis* strains of the 4.ANT lineage from the Tuva mountains and adjacent plague foci

Elizaveta V. Stankovtseva¹, Eugeniy G. Oglodin¹, Dmitry B. Verzhutsky²,
Nadezhda S. Chervyakova¹, Ekaterina A. Naryshkina¹, Andrey V. Fedorov¹,
Galina A. Eroshenko¹, Sergey V. Balakhonov², Vladimir V. Kutyrev¹

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

²Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia

Abstract

Introduction. The Tuva mountain plague focus (TMPF) in Russia has been continuously epizootically active since its discovery in 1964. The strains of *Yersinia pestis* isolated in this focus belong to the phylogenetic lineage 4.ANT of the antique biovar of the main subspecies. They are highly virulent and epidemically significant. The use of modern molecular genetic technologies will make it possible to determine the population structure of 4.ANT strains in the TMPF.

The **aim** of the study was to analyze the phylogenetic and population structure of *Y. pestis* strains of the 4.ANT lineage from the TMPF according to the data of whole-genome SNP (single nucleotide polymorphism) typing and MLVA25 (multiple locus variable number tandem repeats analysis) typing.

Materials and methods. Whole-genome nucleotide sequences of 68 *Y. pestis* strains, including 60 strains of the 4.ANT lineage, were analyzed. Sequencing of strains was performed on the MGI platform. SNP-analysis was performed by sequence alignment in the Snippy v. 4.6 program with subsequent construction of a Maximum Likelihood dendrogram based on the identified core SNPs in the SeaView program. SNPs, being markers for strains of the 4.ANT lineage, were detected using the MEGA11 program. MLVA-genotyping of *Y. pestis* strains of the 4.ANT lineage was performed by searching loci and then counting the number of tandem repeats in the Tandem Repeats Finder program. MLVA-dendrogram construction was performed by UPGMA method in the BioNumerics v. 7.6.3 program.

Results. According to SNP-analysis of *Y. pestis* strains of lineage 4.ANT from the TMPF, the presence of 4 phylogeographic groups was established: T1 (Saglinsky, Tolaylyg and Barlyk mesofoci, 1971–1987), T2 (Karginsky mesofocus, 2014–2024), T3 (Karginsky mesofocus, 1977–2009), T4 (Karginsky, Tolaylyg and Boro-Shai mesofoci, 2006–2013). Eight MLVA-genotypes of strains of 4.ANT lineage from Tuva and variable VNTR loci were identified: *yp1290ms04*, *yp1935ms05*, *yp0559ms15*, *yp4042ms35*, *yp4425ms38*, *yp1108ms45*, *yp4280ms62*, *yp1580ms70*.

Discussion. Among the strains analyzed, the earliest representatives of the 4.ANT branch are strains of the T1 cluster from the TMPF. The population of strains from the Altai Mountains and Mongolia and the population of strains from the TMPF (1977–2024) are represented as separate sub-branches on the tree. The latter population is represented by polytomy and is characterized by pronounced clustering according to the spatial and temporal principle.

Conclusion. The presence of 4 main phylogeographic groups in the population of 4.ANT lineage in the TMPF was determined and genetic differences between them were established, which can be used for in-depth molecular-genetic differentiation and typing of *Y. pestis* strains in this focus.

Keywords: plague, *Yersinia pestis*, Tuva mountain focus, SNP analysis, MLVA typing

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: Stankovtseva E.V., Oglodin E.G., Verzhutsky D.B., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Fedorov A.V., Eroshenko G.A., Balakhonov S.V., Kutyrev V.V. Phylogeny of *Yersinia pestis* strains of the 4.ANT lineage from the Tuva mountains and adjacent plague foci *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):284–295. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-659>
EDN: <https://www.elibrary.ru/SCLRIW>

Введение

Природные очаги чумы расположены на большинстве континентов и постоянно проявляют себя вспышками этой особо опасной инфекции, оставившей глубокий след в истории цивилизации

в доисторический период и в современную эпоху [1]. В последние годы вспышки чумы регистрируются в Демократической Республике Конго, Республике Мадагаскар, Соединённых Штатах Америки, Китайской Народной Республике и Монголии [2].

Чума является природно-очаговой инфекцией с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи возбудителя — бактерии *Yersinia pestis*, которая сохраняется в природных очагах, преимущественно циркулируя между грызунами и паразитирующими на них блохами. В странах Содружества Независимых Государств расположено 45 природных очагов чумы, в том числе 11 из них — в России.

Современная внутривидовая классификация, основанная на данных о мировом генетическом разнообразии возбудителя чумы, делит штаммы *Y. pestis* на 7 подвидов: основной — *ssp. pestis* (античный, средневековый, восточный и промежуточный биовары) и 6 неосновных подвидов [3]. Штаммы основного подвида циркулируют в большинстве природных очагов мира и являются высоковирулентными. Штаммы античного биовара были этиологическими агентами 1-й и 2-й пандемий чумы, Маньчжурской эпидемии лёгочной чумы в Китае в 1910–1911 гг., современных вспышек чумы в Демократической Республике Конго [3, 4]. Штаммы античного биовара генетически разнообразны и относятся по генетической номенклатуре ветвей эволюции к 5 филогенетическим линиям: 0.ANT, 1.ANT, 2.ANT, 3.ANT и 4.ANT, которые в настоящее время встречаются в природных очагах чумы Азии и Африки [5]. Штаммы линии 4.ANT циркулируют в эндемичном мегаочаге, который является трансграничным и охватывает территории Тувинского горного очага чумы (ТГОЧ) и Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в России и природных очагов в Монголии [6]. В других регионах мира штаммы 4.ANT не встречаются. На протяжении многих лет мегаочаг 4.ANT проявляет постоянную эпизоотическую активность. В 2014–2016 гг. в Горно-Алтайском высокогорном очаге произошли 3 случая заболевания чумой человека, вызванные штаммами линии 4.ANT [7, 8]. Заболевание чумой регистрируются и в сопредельном регионе Монголии [2, 9].

Кроме 3 резидентных для *Y. pestis* плазмид вирулентности *pFra*, *pCad* и *pPst*, штаммы 4.ANT содержат плазмиду *pTP33*, которая, по-видимому, кодирует факторы адаптации штаммов *Y. pestis* к условиям природных экосистем этого географического региона [10, 11]. Штаммы 4.ANT выделяются в Горно-Алтайском очаге, начиная с 2012 г. Филогенетическая структура штаммов 4.ANT из Горного Алтая и Монголии хорошо исследована с помощью полногеномного секвенирования и MLVA25-типирования (multiple locus variable number tandem repeats analysis) [6, 12]. В ТГОЧ циркуляция тувинского варианта 4.ANT выявлена еще в 1964 г. [13]. С тех пор эпизоотическая активность в ТГОЧ регистрируется постоянно и с выделением культур *Y. pestis*, однако количество публикаций по молекулярно-генетическим исследованиям популя-

ционной структуры тувинских штаммов 4.ANT достаточно ограничено [6, 12, 14, 15]. Практически отсутствуют публикации по филогенетическому анализу популяционной структуры штаммов 4.ANT по данным полногеномного секвенирования.

ТГОЧ охватывает 3 административных кожууна Тывы: Монгун-Тайгинский, Овюрский и Тэс-Хемский. Основная территория очага расположена у южных склонов горных хребтов Цаган-Шибету и Западного Танну-Ола [16]. Территория очага включает различные географические ландшафты: от степной зоны до альпийских биотопов. Основной чертой эпизоотического процесса в очаге является ярко выраженная микроочаговость, что напрямую связано с наличием отдельных популяций основного носителя — длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*. ТГОЧ включает ряд мезоочагов: Каргинский, Саглинский, Толайлыгский, Барлыкский, Верхне-Барлыкский, Боро-Шайский, Моген-Буренский, Аспайтинский, Кара-Бельдырский, Чозинский и Деспенский [17]. Основным переносчиком на территории очага является блоха *Citellophilus tesquorum*, однако в эпизоотический процесс также вовлечены другие виды блох, иксодовые и гамазовые клещи, вши [18]. Существование отдельных мезоочагов чумы и микроочаговость территории предполагает наличие разных филогеографических популяций и выраженную диверсификацию линии 4.ANT в ТГОЧ. Как эффективный генетический инструмент определения популяционной структуры *Y. pestis* зарекомендовало себя сочетание методов полногеномного SNP-анализа (single nucleotide polymorphism) и MLVA25-типирования [19, 20]. Первый метод позволяет проводить реконструкцию долговременной эволюции *Y. pestis*, а MLVA25 показывает высокую разрешающую способность при изучении близкородственных штаммов, циркулирующих на одной или смежных территориях [21, 22].

ТГОЧ входит в число действующих очагов чумы России. Южная часть очага прилегает к границе с Монголией, на территории которой расположены активные очаги чумы. Развитие туризма, экономических связей и транспортного сообщения в этом регионе может привести к случаям заражения людей чумой и выносу возбудителя за пределы эпизоотических территорий. Планируемое в 2026 г. начало строительства железной дороги Элегест — Кызыл — Курагино также может увеличить угрозу контакта с носителями и переносчиками заболевания. Ещё одну угрозу представляет незаконный промысел местным населением сурка тарбагана, который в последние 10–15 лет начал спорадически вовлекаться в эпизоотию. Напряжённость эпизоотического процесса в ТГОЧ и высокая вирулентность штаммов 4.ANT обуславливают необходимость их всестороннего исследования, определения ареала,

проведения филогенетического анализа и установления современной популяционной структуры с помощью молекулярно-генетических технологий.

Цель работы — филогенетический и популяционный анализ штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из ТГОЧ по данным полногеномного SNP- и MLVA25-типирования.

Материалы и методы

Полногеномный SNP-анализ штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT

В работе использованы полногеномные нуклеотидные последовательности 68 штаммов *Y. pestis*, из которых 60 штаммов, выделенные в 1971–2024 гг., принадлежат к филогенетической линии 4.ANT. Среди них 53 штамма получены в ТГОЧ, 5 штаммов — в Горно-Алтайском очаге и 2 штамма — в Монголии. Штаммы из ТГОЧ выделены от длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus* (26%), тарбагана *Marmota sibirica* (4%); пищухи даурской *Ochotona dauurica* (4%), вшей (11%), блох *Citellophilus tesquorum* (35%), *Oropsylla alaskensis* (4%), *Paramonopsyllus scalloniae* (2%), *Rhadinopsylla li transbaikalica* (6%), *Frontopsylla elatoides* (4%); от клещей *Gamasina* (2%), *Ixodidae* (2%). Штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора.

Штаммы выращивали на агаре или бульоне LB (pH 7,2%) при 28°C 24–48 ч. ДНК выделяли набором «PureLink Genomic DNA Mini Kit» («Invitrogen») согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pestis* получали методом полногеномного секвенирования на платформе MGI (секвенатор «DNBSEQ-G50RS») с использованием наборов реактивов «MGIEasy Fast FS Library Prep Set» и «MGIEasy UDB Primers Adapter Kit A». Полученные риды (фрагменты ДНК, выдаваемые секвенатором) собирали в контиги (набор перекрывающихся сегментов ДНК, которые в совокупности представляют собой консенсусную область ДНК) со средним покрытием на геном 98,56% (50× глубина прочтения). Средний размер собранного генома составил 4,55 млн пар нуклеотидов. В качестве группы сравнения при построении дендрограммы были взяты штаммы *Y. pestis* разных филогенетических линий из базы данных NCBI GenBank: 620024 (NZ_ADPM000000000.1, 0.PE7), Pestoides A (NZ_ACNT000000000.1, 0.PE4), Antiqua (NC_008150.1, 1.ANT), CO92 (NC_003143.1, 1.ORI1), KIM10 (NC_004088.1, 2.MED1), Nepal516 (NC_008149.1, 2.ANT1), MGJZ11 (NZ_ADSU000000000.1, 3.ANT2), MGJZ12 (NZ_ADSV000000000.1, 4.ANT). Также из базы данных NCBI GenBank были взяты последовательности некоторых штаммов 4.ANT: I-3113 (NZ_CP045149.1, 4.ANT), I-3223 (LZNE000000000.1,

4.ANT), 131-133 (M2085) (NZ_CP064125.2, 4.ANT), 256 (M2029) (NZ_CP064123.1, 4.ANT).

Коровые SNP-мутации выявляли путём выравнивания контигов штаммов *Y. pestis* на геноме *Y. pestis* CO92 с помощью программы «Snippy v. 4.6», затем удаляли 28 гомоплазий SNPs, которые появляются независимо у представителей разных филогенетических линий и не отражают единство происхождения [5]. Полученный файл содержал 1133 коровых SNPs. Для построения дендрограммы на основе коровых SNPs использовали модуль PhyML в программе «SeaView». Дендрограмму Maximum Likelihood с моделью нуклеотидных замен — GTR (general time reversible) визуализировали в программе «FigTree v. 1.4.5». Поиск маркерных SNPs выполняли в программе «MEGA11».

MLVA25-генотипирование штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT

Генотипирование выполняли по 25 VNTR-локусам с исключением из анализа локуса *yp3057ms09* [23, 24]. Поиск VNTR-локусов проводили с использованием программы «FragmentFinder v. 0.4» [25]. Число тандемных повторов подсчитывали в программе «Tandem Repeats Finder» при соблюдении следующих параметров: параметры выравнивания — 2, 3, 5 (совпадение, несовпадение, indel соответственно); минимальная оценка соответствия, чтобы сообщить о наличии повтора — 50; максимальный размер периода (лучшее предположение программы по размеру шаблона тандемного повтора) — 500 п.н. [26]. Дендрограмму, основанную на количестве тандемных повторов, строили в программе «BioNumerics v. 7.6.3» («Applied Maths») методом UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean).

Статистическая обработка данных включала расчёт индекса аллельного полиморфизма *h* и оценку дискриминирующей способности метода путём расчёта индекса Хантера–Гастона [27, 28].

Результаты

По результатам полногеномного SNP-анализа проведено филогенетическое исследование и определена популяционная структура штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из ТГОЧ, которая, как установлено, включает 4 основные филогеографические группы (рис. 1). Реконструкция филогенетического родства штаммов выполнена на основе 1133 выявленных коровых SNPs. Филогенетическое дерево на рис. 1 укоренено по штамму *Y. pestis* 620024 (NCBI GenBank: NZ_ADPM000000000.1, 0.PE7) [5]. Места выделения штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT в ТГОЧ показаны на рис. 2.

Поиск SNP-мутаций, лежащих в основе отделения штаммов линии 4.ANT от общего ствола филогенетического дерева *Y. pestis*, выявил 12 специ-

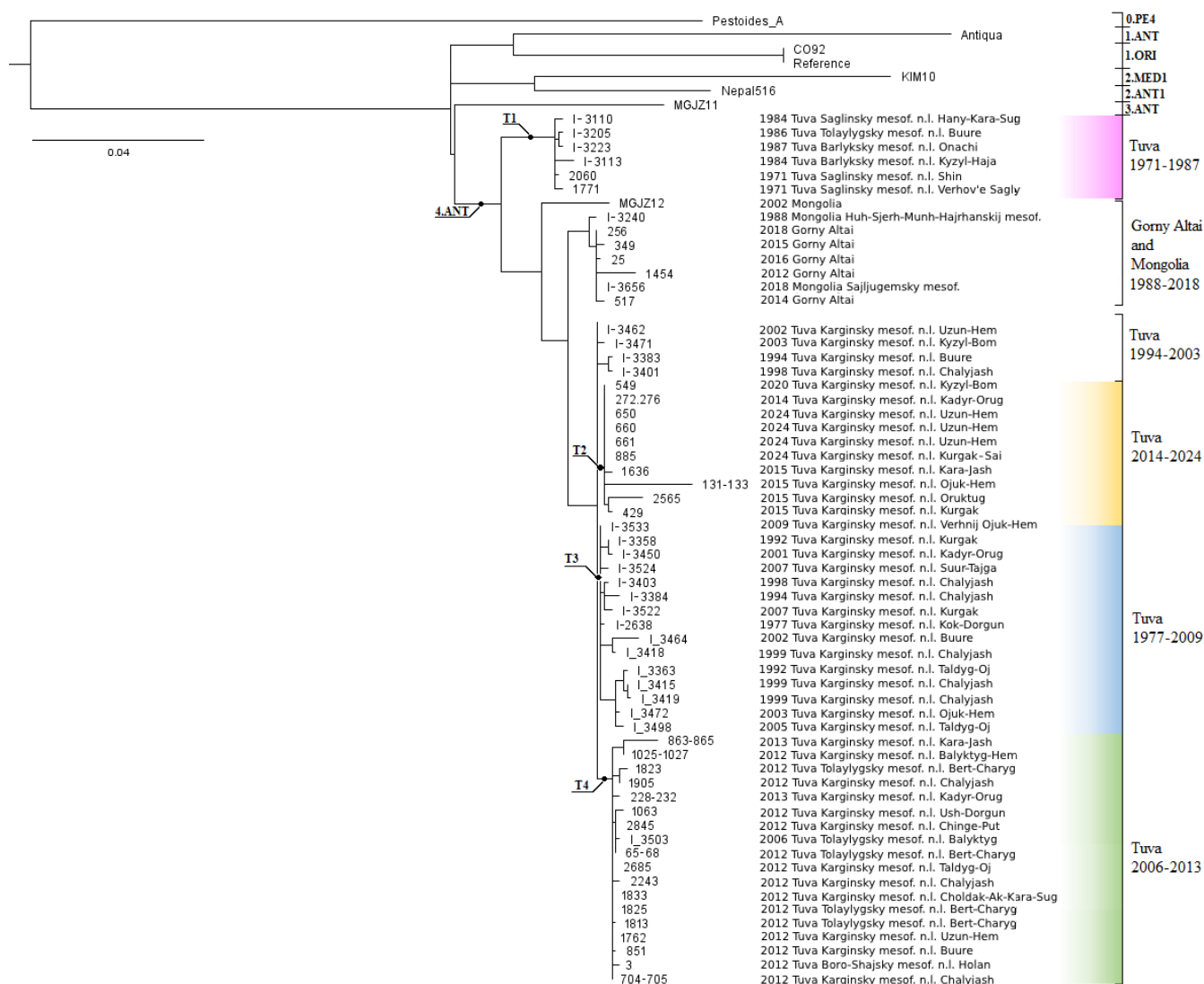


Рис. 1. Дендрограмма Maximum Likelihood штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, построенная по данным полногеномного SNP-анализа на основе 1133 коровых SNPs.

Для построения дендрограммы использовали модуль PhyML программы «SeaView». Применена модель нуклеотидных замен — GTR с 500-кратным бутстрэповским подкреплением. Для визуализации полученной дендрограммы использовали программу «FigTree v. 1.4.5». Для улучшения разрешения рисунка ветвь штамма 620024 на дендрограмме не показана. mesof. — mesofocus (мезоочаг), n. l. — natural landmark (упорище).

фических SNPs, общих для всех штаммов линии 4.ANT. Из них 9 SNPs расположены в генах, кодирующих белки жизнеобеспечения клетки, включая 6 несинонимичных SNP-мутаций. Еще 3 SNP-мутации находятся в межгенном пространстве. Одна из выявленных SNP-мутаций с координатой 1610851 по геному штамма *Y. pestis* CO92 (G→A, ген *rlmKL*) ранее была использована в качестве мишени для детекции штаммов линии 4.ANT в аллель-специфичной ПЦР-РВ [29].

На дендрограмме штаммы *Y. pestis* линии 4.ANT, выделенные на территории ТГОЧ, разделились на четыре филогенетических кластера (филогруппы). В кластер T1, отделившийся от ствола линии 4.ANT раньше остальных, вошли 6 штаммов, полученных в 1971–1987 гг. Это одни из наиболее ранних штам-

мов из ТГОЧ в исследуемой выборке. Штаммы 2060, 1771, I-3110 получены в Саглинском мезоочаге в 1971 и 1984 гг. Штамм I-3205 (1986) выделен в Толайлыгском мезоочаге (ур. Бууре). Геном штамма I-3113 (1984) взят из базы данных NCBI GenBank (NZ_CP045149.1). Штаммы I-3113 и I-3223 (1987) выделены в Барлыкском мезоочаге. Обнаружено 14 SNP-мутаций, характерных только для штаммов кластера T1, из них 12 SNP-мутаций расположены в кодирующей области (9 несинонимичных) и 2 мутации — в межгенном пространстве. От общего с кластером T1 филогенетического узла отходит ветвь, давшая начало остальным штаммам линии 4.ANT.

Между штаммами кластера T1 и другими штаммами линии 4.ANT на дендрограмме распо-

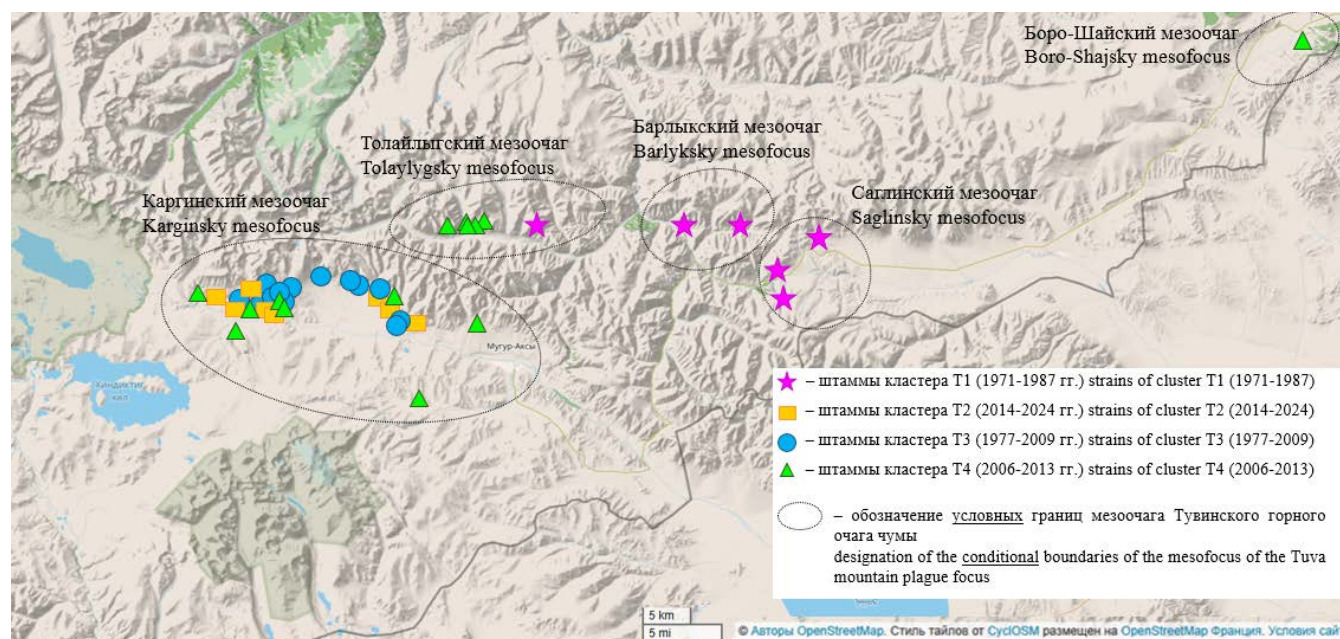


Рис. 2. Распространение штаммов *Y. pestis* филогрупп T1–T4 линии 4.ANT на территории ТГОЧ.

ложен штамм MGJZ12, входящий в состав штаммов группы сравнения [5]. Этот штамм выделен на территории Монголии в 2002 г., что говорит о филогенетической преемственности штаммов 4.ANT, распространённых на этом трансграничном участке природной очаговости чумы.

Отдельный кластер на дендрограмме образован штаммами из Горного Алтая и Монголии. Штамм I-3240 выделен раньше других штаммов этого кластера (1988) на территории Хух-Сэрх-Мунх-Хайрханского очага (Монголия). От общего со штаммом I-3240 предка берут свое начало современные штаммы из Горного Алтая и Монголии (2012–2019 гг.). Эти штаммы относятся к новому мощному клону линии 4.ANT, проявившему себя во втором десятилетии XXI в. в трансграничном участке мегаочага 4.ANT, в том числе случаями заболевания людей чумой в России и Монголии [7, 8]. Выявлены 4 специфических SNP-мутации для штаммов из Горно-Алтайского высокогорного очага России и очагов Монголии, расположенных в кодирующих участках генома.

Все остальные взяты в исследование штаммы из ТГОЧ, представленные на дендрограмме отдельной ветвью, лежат у основания общей политомии. Эта ветвь включает три разных кластера, обозначенных как T2–T4, а также отдельные штаммы (I-3462, 2002; I-3471, 2003; I-3383, 1994; I-3401, 1998), которые не попали ни в один кластер. Все эти штаммы были выделены в Каргинском мезоочаге.

В кластер T2 вошли 10 штаммов, выделенных в 2014–2024 гг. на территории Каргинского мезоочага. От других кластеров их отделяет наличие 2 специфических SNP-мутаций, одна из которых

расположена в кодирующей области с координатой 2774153 по геному CO92 (G→A, ген *YPO_RS13360*, синонимичная).

В кластер T3 вошли штаммы, полученные в Каргинском мезоочаге чумы в 1977–2009 гг. Этот большой кластер образован штаммами, имеющими схожий SNP-профиль. Диверсификация отдельных подкластеров внутри кластера T3 в совокупности с выделением культур возбудителя чумы на протяжении 40 лет на территории этого мезоочага позволяет предположить наличие независимого процесса микроэволюции штаммов кластера T3 в тот период. Штаммы кластера T3 имеют одну общую специфичную SNP-мутацию с координатой 4263645 по геному CO92 (G→T, ген *YPO_RS20065*, несинонимичная).

Штаммы 4.ANT ещё одного кластера — T4 — выделены в Толайлыгском и Каргинском мезоочагах ТГОЧ в 2006–2013 гг. Также в кластер T4 вошел штамм 3 (2012), выделенный в Боро-Шайском мезоочаге. Обнаружены 3 SNP-мутации, специфические для штаммов этого кластера, 2 SNP-мутации являются несинонимичными и расположены в кодирующей области (325289, T→A, ген *YPO_RS02605*; 3972331, C→T, ген *YPO_RS18755*).

Таким образом, на основании проведённого полногеномного SNP-анализа установлено наличие диверсификации штаммов *Y. pestis* 4.ANT в ТГОЧ вследствие независимой микроэволюции возбудителя в изолированных микроочагах чумы, описаны основные филогеографические группы этих штаммов. Охарактеризованы SNP-мутации, специфические для отдельных филогеографических популяций этой линии эволюции возбудителя чумы.

MLVA25-генотипирование штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Тувинского горного очага чумы

Для всех взятых в исследование 60 штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT, полученных в 1971–2024 гг. в ТГОЧ, Горно-Алтайском высокогорном очаге в России и очагах Монголии, проведено MLVA25-генотипирование. По результатам типирования определены 11 MLVA-генотипов (индекс Хантера–Гастона равен 0,78). Вариабельными для штаммов 4.ANT оказались локусы: *yp1290ms04* (количество tandemных повторов 6, 7); *yp1935ms05* (4, 9); *yp0559ms15* (8, 9); *yp4042ms35* (9, 10); *yp4425ms38* (5, 8); *yp1108ms45* (6, 7); *yp3060ms56* (8, 9); *yp4280ms62* (6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14); *yp1580ms70* (4, 5, 6) (таблица). По остальным локусам (*yp0120ms01*; *yp2769ms06*; *yp2916ms07*; *yp1814ms20*; *yp1895ms21*; *yp0581ms40*; *yp0718ms41*; *yp1018ms44*; *yp1335ms46*; *yp2058ms51*; *yp2612ms54*; *yp1118ms69*; *yp1925ms71*; *yp3236ms73*; *yp3245ms74*) все штаммы оказались идентичными. Штаммы из ТГОЧ образовали 8 MLVA-генотипов. Для них оказались вариабельными те же локусы, что и для всех штаммов линии 4.ANT, за исключением *yp3060ms56* (8).

При построении MLVA25-дендрограммы методом UPGMA на основе числа tandemных повторов в VNTR-локусах все исследуемые штаммы из ТГОЧ разделились на 3 крупных кластера: А и В (рис. 3). Разделение штаммов на кластеры и подкластеры совпадает с их пространственно-временным происхождением в очаге: кластер А состоит из штаммов 1971–1987 гг. из Саглинского, Толайлыгского и Барлыкского мезоочагов; кластер В образован штаммами 1977–2024 гг. В состав кластера В входят подкластеры: В1 — территория Каргинского мезоочага (ур. Чалыаш и Кок-Доргун); В2 — Толайлыгский и Каргинский мезоочаги; В3 — Каргинский мезоочаг; В4 — Каргинский и Боро-Шайский мезоочаги. От-

дельный кластер на дендрограмме образован штаммами из Горного Алтая и Монголии.

В кластер А, как и при полногеномном SNP-анализе, вошли одни из наиболее ранее выделенных штаммов из Тувы. Это 3 штамма из Саглинского мезоочага (I-3110, 1984 г.; 2060 и 1771, 1971 г.), штамм I-3205 из Толайлыгского мезоочага (1986 г.) и штаммы из Барлыкского мезоочага (I-3223, 1987 г.; I-3113, 1984 г.). MLVA-профиль этой группы сильно отличается от остальных штаммов линии 4.ANT. Наличие 2 аллелей в локусе *yp4425ms38* (5 и 8) и 2 аллелей в локусе *yp1108ms45* (6 и 7) лежит в основе формирования у штаммов кластера А трех MLVA-генотипов: Tuv.6, Tuv.7 и Tuv.8. Штаммы I-3110, 2060 и 1771 из Саглинского мезоочага имеют в VNTR-локусе *yp4425ms38* 8 tandemных повторов и 6 повторов в локусе *yp1108ms45* (генотип Tuv.6). Генотип Tuv.7, отличающийся наличием 5 повторов в локусе *yp4425ms38* и 6 повторов в локусе *yp1108ms45*, имеют штаммы I-3205 (1986) и I-3223 (1987). Штамм I-3113 (1984), имеющий 5 повторов в локусе *yp4425ms38* и 7 tandemных повтора в VNTR-локусе *yp1108ms45*, относится к отдельному генотипу Tuv.8.

Кластер В образовали все остальные исследованные штаммы *Y. pestis* 4.ANT из ТГОЧ 1977–2024 гг. выделения. Это достаточно однородная по MLVA-профилю группа. Лишь наличие 3 аллелей в локусе *yp4280ms62* (11, 12, 13) и 2 аллелей в локусе *yp1580ms70* (4, 5) лежит в основе разделения штаммов на подкластеры В1, В2, В3 и В4 и формирования 4 генотипов (Tuv.4, Tuv.1, Tuv.2, Tuv.3) соответственно.

Подкластер В1 образовали 2 штамма из Каргинского мезоочага — I-2638 (1977 г., ур. Кок-Доргун) и I-3403 (1998 г., ур. Чалыаш). В основе формирования генотипа Tuv.4 лежит наличие 4 повторов в локусе *yp1580ms70*. Наиболее схожий MLVA-профиль имеют штаммы кластера В3, которые на дереве берут свое начало от штаммов кластера В1. В подкластер В3 вошли штаммы, выделенные в 1992–2015 гг. в Каргинском мезоочаге. Штаммы кластера В1 и В3 (генотипы Tuv.4 и Tuv.2) объединяет наличие 12 tandemных повторов в локусе *yp4280ms62*. Подкластер В2 (генотип Tuv.1) образован 18 штаммами, выделенными на территории Толайлыгского и Каргинского мезоочагов (2002–2013 гг.). У штаммов генотипа Tuv.1 в локусе *yp4280ms62* имеется 11 VNTR-повторов. Наличие 13 повторов в локусе *yp4280ms62* отделяет 7 штаммов, образовавших подкластер В4 (2002–2024 гг.). Сюда вошли штаммы из Каргинского мезоочага, а также штамм 3 (2012 г.) из Боро-Шайского мезоочага. Штамм *Y. pestis* 549, выделенный в 2020 г. на территории ур. Кызыл-Бом (Каргинский мезоочага), не вошёл ни в один кластер, образованный другими штаммами из ТГОЧ. Это единственный

Характеристика вариабельных VNTR-локусов штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT при MLVA25-генотипировании

VNTR-локус	Длина повтора, п.н.	Количество аллелей и копий повтора в VNTR-локусе	Индекс аллельного полиморфизма <i>h</i>
<i>yp1290ms04</i>	17	6, 7	0,19
<i>yp1935ms05</i>	17	4, 9	0,03
<i>yp0559ms15</i>	15	8, 9	0,35
<i>yp4042ms35</i>	15	9, 10	0,19
<i>yp4425ms38</i>	16	5, 8	0,10
<i>yp1108ms45</i>	12	6, 7	0,03
<i>yp3060ms56</i>	16	8, 9	0,21
<i>yp4280ms62</i>	9	6, 7, 9, 10, 11, 12, 13	0,74
<i>yp1580ms70</i>	9	4, 5, 6	0,44

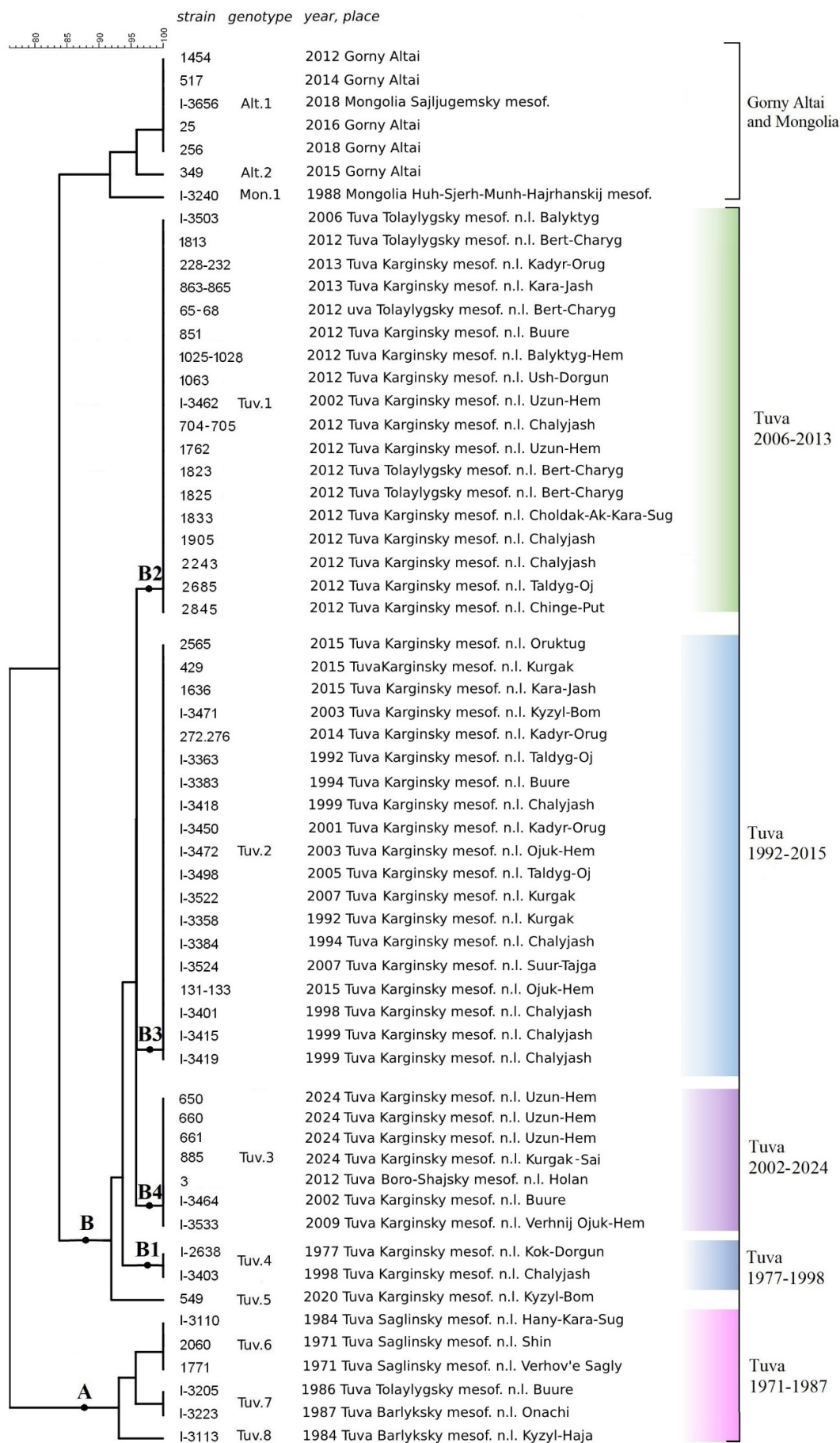


Рис. 3. MLVA-дендрограмма штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, полученных в 1971–2024 гг. в ТГОЧ, Горно-Алтайском высокогорном очаге в России и очагах Монголии по данным MLVA25-генотипирования, построенная методом UPGMA. mesof. — mesofocus (мезоочаг), n. l. — natural landmark (урочище).

штамм, который в локусе *up1935ms05* имеет 5 тандемных повторов, что обуславливает наличие у него характерного MLVA-генотипа Tuv.5.

Отдельный кластер на дендрограмме образовали штаммы из Горного Алтая и Монголии (генотипы Alt.1, Alt.2, Mon.1).

Обсуждение

В Туве, Горном Алтае и на сопредельной территории Монголии расположен природный мегаочаг чумы, в котором распространены эндемичные для этого региона штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT античного биовара основного подвида. Они высоковирулентны и эпидемически значимы. Использование современных молекулярно-генетических технологий необходимо для анализа популяционной структуры и направлений микроэволюции штаммов 4.ANT, определения разнообразия генотипов и территорий их распространения, что важно для повышения эффективности эпидемиологического мониторинга в этих активно действующих очагах Сибири. На протяжении ряда последних лет использование полногеномного SNP-анализа и MLVA-типирования доказывает эффективность этих методов для отслеживания эволюции и типирования штаммов *Y. pestis*, а также при эпидемических расследованиях и для контроля эпизоотий чумы [6, 12, 15, 20–23, 30, 31].

Проведённое нами филогенетическое исследование по данным полногеномного SNP-анализа 60 штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из природного мегаочага чумы показало, что наиболее рано дивергировавшими от ствола эволюции этой линии являются штаммы из ТГОЧ 1971–1987 гг. На филогенетическом дереве штаммы этого периода образовали близкородственный кластер, в который вошли штаммы, выделенные в Саглинском (1971, 1984 гг.), Барлыкском (1984, 1987 гг.) и Толайлыгском (1986 г.) мезоочагах. Впервые штаммы на этой территории выделены в Саглинском мезоочаге в 1966 г., в Барлыкском в 1983 г. и в Толайлыгском в 1985 г. [16]. После проведения крупномасштабных дезинсекционных мероприятий в 1981–1985 гг. в Саглинском мезоочаге культуры *Y. pestis* здесь больше не выделялись. Выполненный филогенетический анализ показал, что тувинские штаммы из кластера 1971–1987 гг. являются эволюционно более ранними и предшествуют на дендрограмме всем другим взятым в исследование штаммам *Y. pestis* из мегаочага 4.ANT в Туве и Горном Алтае.

За штаммами этого кластера на дендрограмме следуют две современные ветви эволюции, одна из которых включает штаммы 4.ANT 1988–2019 гг. из Горно-Алтайского высокогорного очага в России и очагов в Монголии (Сайлюгемский и Хух-Сэрх-Мунх-Хайрханский). Вторая ветвь 4.ANT состоит из тувинских штаммов 1977–2024 гг. преимущественно из Каргинского мезоочага.

SNP-профиль этой ветви тувинских штаммов значительно отличается от штаммов кластера 1971–1987 гг., что позволяет предположить последующую независимую микроэволюцию 4.ANT на территории Каргинского мезоочага. У этой ветви тувинских штаммов выражены кластеризация по пространственно-временному принципу и их диверсификация в пределах отдельных кластеров, что указывает на продолжающийся процесс независимой микроэволюции линии 4.ANT в ТГОЧ.

Ранее было показано, что метод MLVA25-типирования имеет значительную дискриминирующую способность в отношении штаммов *Y. pestis* основного и неосновного подвида из ТГОЧ и Горно-Алтайского высокогорного очага чумы соответственно [15]. Показано, что штаммы кластеризовались на основе числа тандемных повторов как на уровне популяций (разделение штаммов в зависимости от очага), так и на внутрипопуляционном уровне (разделение штаммов внутри одного очага). Полученные нами данные подтверждают разнообразие MLVA25-генотипов штаммов линии 4.ANT, выделенных на территории Республики Тыва, в Горном Алтае и Монголии. При этом данные MLVA25- и SNP-типирования совпадают, что доказывает перспективность комплексного использования этих двух современных методов для реконструкции долговременной эволюции и анализа популяционной структуры штаммов 4.ANT. Высокие дискриминирующие возможности метода MLVA25 в определении внутрипопуляционной структуры штаммов *Y. pestis* позволят в дальнейшем эффективно отслеживать генетическую изменчивость возбудителя чумы в природном мегаочаге 4.ANT на территории Тувы и Горного Алтая.

Заключение

На основе данных полногеномного SNP-анализа 60 штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из расположенного в России и Монголии природного мегаочага чумы определена филогенетическая структура штаммов 4.ANT из ТГОЧ, отражающая пространственно-временную циркуляцию возбудителя в этом очаге. Установлено наличие 4 основных филогеографических групп штаммов 4.ANT из ТГОЧ. Филогруппа Т1 включает штаммы из Саглинского, Барлыкского и Толайлыгского мезоочагов периода 1971–1987 гг. К филогруппе Т2 относятся 10 штаммов, выделенных в 2014–2024 гг. в Каргинском мезоочаге. Филогруппа Т3 включает штаммы из Каргинского мезоочага, полученные в 1977–2009 гг. Филогруппа Т4 состоит из штаммов 2006–2013 гг. выделения из Каргинского, Толайлыгского и Боро-Шайского мезоочагов. Выявлены маркерные для филогенетических узлов 4.ANT дендрограммы SNP-мутации, которые могут быть

использованы для расширенной молекулярно-генетической идентификации штаммов из ТГОЧ. С помощью MLVA25-типирования установлено наличие 8 MLVA-генотипов для тувинской популяции 4.ANT и определены вариабельные VNTR-локусы. Выявленное генетическое разнообразие штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT связано с микроэволюцией отдельных филогеографических групп в различных микроочагах в ТГОЧ. Выраженная диверсификация отличает популяцию 4.ANT из ТГОЧ от популяции 4.ANT из Горно-Алтайского очага, которая характеризуется значительной генетической однородностью.

Таким образом, штаммы линии 4.ANT из трансграничного мегаочага чумы в России и Монголии являются удобной моделью для исследования влияния условий существования на особенности микроэволюции различных филогеографических популяций *Y. pestis*. Полученные результаты полногеномного SNP-анализа и MLVA25-типирования могут быть использованы для молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из ТГОЧ, детализации молекулярно-генетической паспортизации территории и повышения эффективности молекулярно-эпидемиологического мониторинга ТГОЧ и сопредельных очагов чумы России и Монголии. На фоне растущего туристического потока и строительства новых транспортных сетей полученные данные могут способствовать снижению рисков заболевания чумой людей и выноса возбудителя за пределы эпизоотических территорий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Попов А.Ю., Кутырев В.В. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств. Саратов;2022. Popov A.Yu., Kuttyrev V.V. *Atlas of Natural Plague foci in Russia and Foreign Countries*. Saratov;2022.
2. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А. и др. Эпидемиологическая ситуация по чуме в мире. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024;(1):67–75. Popov N.V., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., et al. Epidemiological situation on plague around the world. forecast of epizootic activity of natural plague foci in the Russian Federation for 2024. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024;(1):67–75. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-67-75> EDN: <https://elibrary.ru/rqmbal>
3. Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Исторические и современные классификации возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(4):14–22. Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kuttyrev V.V. Historical and modern classifications of the plague agent. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(4):14–22. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-4-14-22> EDN: <https://elibrary.ru/jsctzk>
4. Ерошенко Г.А., Батиева Е.Ф., Кутырев В.В. Палеогеномика возбудителя чумы и перспективы палеогеномных исследований на территории России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(2):13–28. Eroshenko G.A., Batieva E.F., Kuttyrev V.V. Paleogenomics of the plague agent and prospects for paleogenomic studies in Russia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(2):13–28. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-2-13-28> EDN: <https://elibrary.ru/hqaofy>
5. Cui Y., Yu C., Yan Y., et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013;110(2):577–82. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1205750110>
6. Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Краснов Я.М. и др. Природный мегаочаг основного подвида *Yersinia pestis* античного биовара филогенетической ветви 4.ANT в Горном Алтае. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018;(2):49–56. Eroshenko G.A., Popov N.V., Krasnov Ya.M., et al. Natural mega-focus of *Yersinia pestis* main subspecies, antique biovar, phylogenetic line 4.ANT in Gorny Altai. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2018;(2):49–56. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-49-56> EDN: <https://elibrary.ru/usvwoe>
7. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б. и др. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;(4):9–16. Kuttyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., et al. Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootiological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;(4):9–16. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-4-9-16> EDN: <https://elibrary.ru/tdyaej>
8. Балахонов С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И. и др. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(1):55–60. Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., et al. A case of human infection with plague in the Kosh-Agach region of the Republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-epidemiological and epizootiological aspects. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(1):55–60. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-51-55> EDN: <https://elibrary.ru/vozpof>
9. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А. и др. Совершенствование эпидемиологического надзора за природными очагами чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(1):67–74. Popov N.V., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., et al. Improvement of epidemiological surveillance of natural plague foci of the Russian Federation and the forecast of their epizootic activity for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(1):67–74. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-67-74> EDN: <https://elibrary.ru/xouzbd>
10. Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М. и др. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015;(4):82–5. Oglo-din E.G., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., et al. Tructural-functional analysis of cryptic plasmids in *Yersinia pestis* strains from two natural plague foci of Russia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2015;(4):82–5. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-82-85>
11. Афанасьев М.В., Балахонов С.В., Токмакова Е.Г. и др. Анализ нуклеотидной последовательности криптической

- плазмиды pTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы. *Генетика*. 2016;52(9):1012–20. Afanas'ev M.V., Balakhonov S.V., Tokmakova E.G., et al. Analysis of complete sequence of cryptic plasmid pTP33 from *Yersinia pestis* isolated in Tuva natural focus of plague. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(9):1012–20.
DOI: <https://doi.org/10.7868/S0016675816090022>
EDN: <https://elibrary.ru/wlnejp>
12. Ерошенко Г.А., Балькова А.Н., Краснов Я.М. и др. Сравнительный генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на плато Укок и других территориях Горного Алтая. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(4):59–69. Eroshenko G.A., Balykova A.N., Krasnov Ya.M., et al. Comparative genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated on the Ukok plateau and other territories of the Altai Mountains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(4):59–69.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-4-59-69>
EDN: <https://elibrary.ru/uctrsu>
 13. Летов Г.С. Хархира-Мунгунтайгинский участок Алтайского очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1969;6(2):37–45. Letov G.S. Kharkhira-Munguntayginsky section of the Altai plague outbreak. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 1969;6(2):37–45.
 14. Романова И.Ф. Шестопалов М.Ю., Балахонов С.В. Изучение дискриминирующего потенциала мультилокусного VNTR-анализа (MLVA) по выявлению межпопуляционного полиморфизма у изолятов *Yersinia pestis* из Тувинского и Горно-Алтайского природных очагов чумы. *Журнал инфекционной патологии*. 2009;16(3):186–7. Romanova I.F. Shestopalov M.Yu., Balakhonov S.V. To study the discriminating potential of multilocus VNTR analysis (MLVA) to identify interpopulation polymorphism in *Yersinia pestis* isolates from Tuvan and Gorno-Altai natural plague foci. *Journal of Infectious Pathology*. 2009;16(3):186–7. EDN: <https://elibrary.ru/ejajpt>
 15. Афанасьев М.В. Половинкина В.С., Балахонов С.В. и др. Использование 25-локусов VNTR-анализа для инфравидового генотипирования *Yersinia pestis* из Горно-Алтайского и Тувинского природных очагов чумы. В кн.: *Молекулярная диагностика — 2010: сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том 1*. М.;2010:361–3. Afanas'ev M.V. Polovinkina V.S., Balakhonov S.V., et al. The use of 25 VNTR analysis loci for the infraspecific genotyping of *Yersinia pestis* from the Gorno-Altai and Tuvan natural plague foci. In: *Molecular Diagnostics – 2010: Proceedings of the VII All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation. Volume 1*. Moscow;2010:361–3.
 16. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Холин А.В. и др. *Тувинский природный очаг чумы*. Иркутск;2019. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Kholin A.V., et al. *Tuva Natural Plague Focus*. Irkutsk;2019. EDN: <https://elibrary.ru/aczoxn>
 17. Вержуцкий Д.Б., Ткаченко С.В., Галацевич Н.Ф. и др. Обнаружение новых эпизоотических участков в Тувинском природном очаге чумы. *Национальные приоритеты России*. 2016;(4):17–21. Verzhutskiy D.B., Tkachenko S.V., Galatsevich N.F., et al. New epizootic areas detection in Tuvan plague natural focus. *Russia's National Priorities*. 2016;(4):17–21. EDN: <https://elibrary.ru/raiksb>
 18. Вержуцкий Д.Б., Базанова Л.П., Вержуцкая Ю.А. Эпизоотологическое значение массовых видов блох длиннохвостого суслика в природных очагах чумы. *Байкальский зоологический журнал*. 2020;28(2):105–9. Verzhutsky D.B., Bazanova L.P., Verzhutskaya Ju.A. Epizootological significance of fleas — common parasites of longtailed ground squirrels in natural plague foci. *Baikal Zoological Journal*. 2020;28(2):105–9. EDN: <https://elibrary.ru/fyaaff>
 19. Vogler A.J., Chan F., Wagner D.M., et al. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011;9(5):e1319.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001319>
 20. Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Гладких А.С. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(3):34–42. Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Gladkikh A.S., et al. Molecular-genetic characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in the Mongolian territory of transboundary Sailyugem natural plague focus. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(3):34–42.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-34-42>
EDN: <https://elibrary.ru/mlygiw>
 21. Ярыгина М.Б., Корзун В.М., Балахонов С.В. и др. Генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. central asiatica biovar altaica в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы при MLVA25-типировании. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(2):138–49. Yarygina M.B., Korzun V.M., Balakhonov S.V. MLVA25-typed *Yersinia pestis* ssp. central asiatica biovar Altaica genotype structure in Gorno-Altai mountain natural plague focus. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(2):138–49.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-138-147>
EDN: <https://elibrary.ru/hqwoiw>
 22. Горюнова П.А., Куклева Л.М. Балькова А.Н. и др. MLVA25- и CRISPR-генотипы штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(4):68–76. Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Balykova A.N., et al. MLVA25 and CRISPR genotypes of *Yersinia pestis* strains from the Caspian sandy plague focus. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(4):68–76.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-4-68-76>
EDN: <https://elibrary.ru/mzqwsh>
 23. Li Y., Cui Y., Hauck Y., et al. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: Insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*. 2009;4(6):e6000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006000>
 24. Vogler A.J., Keys C.E., Allender C., et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat. Res.* 2007;616(1-2):145–58.
DOI: [10.1016/j.mrfmmm.2006.11.00722](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.00722)
 25. Коврижников А.В., Балькова А.Н., Шевченко К.С. и др. Программа для ЭВМ «FramgentFinder v0.4: программа для поиска фрагментов в бактериальном геноме». Свидетельство №2024668532;2024. Kovrizhnikov A.V., Balykova A.N., Shevchenko K.S. et al. The computer program "FramgentFinder v0.4: a program for searching fragments in the bacterial genome". Certificate No. 2024668532;2024.
 26. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(2):573–80.
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573>
 27. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986;51(5):873–84.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.51.5.873-884.1986>
 28. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(11):2465–6.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
 29. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Макашова М.А. и др. Разработка комплексной системы молекулярно-генетической идентификации штаммов *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(1):126–31. Nikiforov K.A., Oglo-din E.G., Makashova M.A., et al. Development of an integrated system for molecular-genetic identification of *Yersinia pestis* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(1):126–31.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-126-131>
EDN: <https://elibrary.ru/drdrorj>

30. Li J., Wang Y., Liu F., et al. Genetic source tracking of human plague cases in Inner Mongolia-Beijing, 2019. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021;15(8):e0009558.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009558>

Информация об авторах

Станковцева Елизавета Валерьевна[✉] — м. н. с. лаб. молекулярной микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, stankovtseva2101@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-4735-3311>

Оглодин Евгений Геннадьевич — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. молекулярной микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, e.oglodin@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>

Верхуцкий Дмитрий Борисович — д-р биол. наук, г. н. с. зоолого-паразитологического отдела Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, verzh58@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5139-616X>

Червякова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, с. н. с. отдела «Государственная коллекция патогенных бактерий» Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Нарышкина Екатерина Александровна — н. с. лаб. геномного и протеомного анализа Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Федоров Андрей Витальевич — м. н. с. лаб. геномного и протеомного анализа Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Ерошенко Галина Александровна — д-р биол. наук, г. н. с. лаб. молекулярной микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, geroshenko@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Балахонов Сергей Викторович — д-р мед. наук, профессор, директор Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Кутырев Владимир Викторович — д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Участие авторов: Станковцева Е.В. — проведение исследования, анализ данных, написание текста; Оглодин Е.Г., Верхуцкий Д.Б. — анализ данных, научное редактирование рукописи; Червякова Н.С. — работа с культурами; Нарышкина Е.А., Федоров А.В. — секвенирование штаммов; Ерошенко Г.А. — концепция исследования, написание текста; Балахонов С.В., Кутырев В.В. — руководство и организация исследовательской работы. 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 03.03.2025;
принята к публикации 14.05.2025;
опубликована 28.06.2025

31. Zuo X., Liu F., Hu Y., et al. Genomic diversity and transmission patterns of *Yersinia pestis* in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Commun. Biol.* 2024;7(1):1480.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-024-07190-6>

Information about the authors

Elizaveta V. Stankovtseva[✉] — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, stankovtseva2101@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-4735-3311>

Eugeny G. Oglodin — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of Molecular microbiology, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, e.oglodin@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>

Dmitry B. Verzhutsky — D. Sci. (Biol.), chief researcher, Zoological and parasitology department, Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, verzh58@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5139-616X>

Nadezhda S. Chervyakova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of "State Collection of Pathogenic Bacteria", Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Ekaterina A. Naryshkina — researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Andrey V. Fedorov — junior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Galina A. Eroshenko — D. Sci. (Biol.), chief researcher, Laboratory of molecular microbiology, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, geroshenko@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Sergey V. Balakhonov — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

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

Authors' contribution: Stankovtseva E.V. — conducting the study, data analysis, writing the text; Oglodin E.G., Verzhutsky D.B. — data analysis, scientific editing of the article; Chervyakova N.S. — working with cultures; Naryshkina E.A., Fedorov A.V. — sequencing of strains; Eroshenko G.A. — research concept, writing the text; Balakhonov S.V., Kutyrev V.V. — management and organization of research work. 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 03.03.2025;
accepted for publication 14.05.2025;
published 28.06.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-669>



Стабильность вакцинных штаммов сезонной живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK

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

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Подавляющее большинство гриппозных вакцин в мире производится с использованием развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) в качестве субстрата, однако активно обсуждается вопрос о переводе производства вакцин на перевиваемые клеточные линии, что обеспечит бесперебойность в условиях пандемии птичьего гриппа, а также позволит применять вакцину у лиц с аллергией на куриный белок. При накоплении вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины (ЖГВ) в клетках млекопитающих могут возникать адаптационные мутации, влияющие на антигенные и иммуногенные свойства вакцины.

Цель работы — изучить биологические свойства вакцинных штаммов ЖГВ подтипов А/Н1N1 и А/Н3N2, полученных классическим способом в РКЭ, при их адаптации к культуре клеток почки собаки Мадина–Дарби (MDCK).

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы для аттенуированной ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) и А/17/Техас/12/30 (H3N2). Мы провели серийное пассирование этих вирусов на MDCK и проанализировали ростовые свойства изолированных методом бляшек клонов *in vitro* и *in vivo*, их иммуногенность, перекрёстную реактивность и защитную эффективность на модели мышей, а также с использованием гипериммунных крысиных сывороток. Экспериментальные серии вакцинных штаммов ЖГВ А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1), А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) и В/60/Пхукет/2013/26 были наработаны на культуре MDCK в ГНЦ ВБ «Вектор». Мы провели секвенирование генов поверхностных белков клеточных моновакцин и сравнили мутации, обнаруженные в гемагглютанине и нейраминидазе при адаптации к культуре клеток MDCK в лабораторных и производственных условиях.

Результаты. Секвенирование поверхностных антигенов MDCK-адаптированных вариантов вируса А/Н1N1 обнаружило адаптационные мутации в молекуле гемагглютинина — N156D (субъединица HA1) и A44V (субъединица HA2), одновременное присутствие которых усиливало репликативные свойства вакцинного штамма ЖГВ H1N1 в культуре клеток MDCK. Изучение данного адаптированного к культуре клеток MDCK варианта в эксперименте на мышах не выявило влияния обнаруженных мутаций на иммуногенные и протективные свойства вакцины. Адаптация вакцинного штамма ЖГВ H3N2 к культуре клеток MDCK привела к появлению существенно большего количества замен в молекуле HA, по сравнению с вирусом H1N1. Мутации Y85E и N154K в HA2 являются критическими для размножения вируса в культуре клеток, а набор мутаций P215T в HA1 и W92G, D160H в HA2 дали вакцинному штамму существенное преимущество для размножения в культуре клеток MDCK, что может быть эффективно использовано в производстве культуральной ЖГВ.

Обсуждение. Изучение производственных серий культуральных ЖГВ показало наличие адаптационных мутаций в молекуле гемагглютинина штаммов H1N1 (K116E в субъединице HA2) и H3N2 (S219Y и N246K в субъединице HA1). Все изученные адаптационные мутации не влияли на антигенность вакцинных штаммов.

Заключение. Полученные в ходе исследования данные указывают на перспективность производства культуральной ЖГВ из реассортантных штаммов, подготовленных стандартным путём в РКЭ.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина, культура клеток MDCK, адаптационные мутации, гемагглютинин, антигенность, 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 сотруднице ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Е.А. Нечаевой за предоставление экспериментальных серий моновалентных ЖГВ, наработанных на MDCK в условиях промышленного производства.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 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., Степанова Е.А., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Стабильность вакцинных штаммов сезонной живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):296–309.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-669>

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

Stability of vaccine strains of seasonal live attenuated influenza vaccines when adapted to MDCK cell culture

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

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Currently, the vast majority of influenza vaccines in the world are produced using developing chicken embryos as substrate, but there is an urgent necessity for transferring vaccine production to continuous cell lines, which would ensure uninterrupted production during an avian influenza pandemic and also allow the vaccine to be administered to individuals with chicken protein allergies. When vaccine strains of live attenuated influenza vaccine (LAIV) grow in mammalian cells, adaptation mutations can occur that may affect the antigenic and immunogenic properties of the vaccine.

The aim of the study is to investigate the biological properties of vaccine strains of LAIV subtypes A/H1N1 and A/H3N2, produced by the classical reassortment in eggs, when adapted to Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell culture.

Materials and methods. In current study, LAIV strains A/17/California/2009/38 (H1N1pdm09) and A/17/Texas/12/30 (H3N2) were used. These viruses were passaged on MDCK 5 times and the growth properties of the isolated clones by the plaque assay were analyzed *in vitro* and *in vivo*, also immunogenicity, cross-reactivity and protective efficacy were estimated on a mouse model, as well as using hyperimmune rat sera. Experimental series of LAIV strains A/17/Bolivia/2013/6585 (H1N1), A/17/Switzerland/2013/1 (H3N2) and B/60/Phuket/2013/26 were produced on MDCK cells at the Vector State Research Center of Virology and Biotechnology. The surface protein genes of monovalent vaccines were sequenced, and the mutations in HA and NA were identified and compared between adaptation to MDCK culture in laboratory and industrial conditions.

Results. Sequencing of surface antigens of MDCK-adapted variants of the A/H1N1 virus revealed adaptation mutations in the hemagglutinin molecule N156D (HA1 subunit) and A44V (HA2 subunit), which enhanced the replicative properties of the H1N1 vaccine strain in MDCK cells. The study of this MDCK-adapted variant in a mouse experiment showed no effect of the detected mutations on the immunogenic and protective properties of the vaccine. Adaptation of the H3N2 vaccine strain to MDCK cells resulted in a significantly higher number of substitutions in the HA molecule compared to the H1N1 virus, and it was shown that the Y85E and N154K mutations in HA2 are critical for virus multiplication in cell culture, and the set of mutations P215T in HA1 and W92G, D160H in HA2 gave the vaccine strain a significant advantage for growth in MDCK cells, which can be effectively used in the production of cell-based LAIVs.

Discussion. The study of the MDCK cell-produced series of LAIVs showed the presence of adaptation mutations in the hemagglutinin molecule of the H1N1 (K116E in the HA2 subunit) and H3N2 (S219Y and N246K in the HA1 subunit) strains. It is important to note that all the adaptation mutations studied did not affect the antigenicity of the vaccine strains.

Conclusion. In general, the data obtained in the course of the study indicate the feasibility of producing a culture-based live attenuated influenza vaccine from vaccine strains prepared by classical reassortment in eggs.

Keywords: live attenuated influenza vaccine, MDCK cell line, adaptation mutations, hemagglutinin, antigenicity, immunogenicity

Ethics approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the "Consensus Author Guidelines for Animal Use" (IAVES, 23.07.2010). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (protocol No. 1/20 dated 27.02.2020).

Acknowledgment. The authors express their gratitude towards E.A. Nechaeva, an employee of the Federal State Budgetary Scientific Institution of Science, State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, for providing experimental series of monovalent LAIV produced on MDCK under industrial production conditions.

Funding source. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FGWG–2025–0015).

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., Stepanova E.A., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Stability of vaccine strains of seasonal live attenuated influenza vaccines when adapted to MDCK cell culture. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):296–309.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-669>

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

Введение

Профилактика гриппа в виде ежегодной вакцинации представляет собой наиболее эффективный способ борьбы с этой инфекцией [1]. На протяжении более 70 лет аллантоисная жидкость развивающегося куриного эмбриона (РКЭ) признавалась наиболее оптимальным субстратом для накопления большого объема вирусосодержащего материала, что позволяло производить достаточное количество доз вакцин для сезонной вакцинопрофилактики [2, 3]. Однако вспышка высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 в Гонконге в 1997 г., а с 2003 г. — широкомасштабное распространение данной инфекции по всему миру заставили научное сообщество задуматься о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, поскольку такое производство не будет зависеть от своевременной поставки РКЭ в условиях циркуляции птичьего гриппа [4]. Кроме того, наработка вакцинных вирусов в клеточной культуре позволяет избежать появления яично-адаптационных мутаций в вакцинных штаммах, которые оказывают негативное влияние на антигенность и иммуногенность вакцины и, как следствие, снижают её профилактическую эффективность [5, 6]. Самой распространённой перевиваемой линией для производства гриппозных вакцин является культура клеток почки собаки Мадина–Дарби (MDCK), на которой в настоящее время производится культуральная инактивированная гриппозная вакцина FluCellVax [7]. Также важным преимуществом культуральной гриппозной вакцины является возможность её применения у лиц, страдающих аллергией на куриный белок.

Подготовка вакцинных штаммов для отечественной лицензированной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) в настоящее время возможна только методами классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах, в которых получение вакцинной формулы 6 : 2 происходит по отработанному протоколу и обычно позволяет получить требуемый вакцинный штамм [8]. Для перевода производства ЖГВ с РКЭ на культуру клеток MDCK ранее были проведены исследования по получению вакцинных штаммов в культуре клеток MDCK, в ходе которых было показано, что при реассортации в данной клеточной линии эпидемического вируса и донора аттенуации практически не происходило формирования вакцинного штамма с необходимой формулой генома 6 : 2 [9]. С 2019 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в рекомендациях актуальных штаммов вирусов гриппа для сезонных гриппозных вакцин разделила штаммы для культуральных и «яичных» гриппозных вакцин, поскольку множество исследований показали, что для производства вакцин следует использовать штаммы, выделенные на том же субстрате, во избежание по-

явления адаптационных мутаций [10]. Решить вопрос получения вакцинных штаммов ЖГВ в культуре клеток MDCK можно с использованием методов обратной генетики для сборки вирусов гриппа с заданным набором генов, однако наличие патента у компании «MedImmune» на данную технологию исключает возможность её использования для коммерческого производства [11].

В связи с вышеизложенным одним из вариантов получения культуральной ЖГВ является использование вакцинных штаммов, полученных классической реассортацией в РКЭ, для их накопления на перевиваемой клеточной линии. Поскольку меняется субстрат для накопления вакцинных вирусов, необходимо изучить стабильность основных биологических свойств вакцинных штаммов ЖГВ при их адаптации к клеточной линии.

Целью настоящей работы явилось выявление возможных адаптационных мутаций в вакцинных штаммах ЖГВ A/H1N1 и A/H3N2, полученных методом классической реассортации в РКЭ, при их адаптации к культуре клеток MDCK, с последующей оценкой влияния обнаруженных мутаций на ростовые характеристики вирусов, их иммуногенность, кросс-реактивность и протективную активность в эксперименте. Кроме того, в рамках работы была проанализирована экспериментальная серия культуральной ЖГВ, произведённая ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» на культуре клеток MDCK с использованием промышленных биореакторов [12].

Материалы и методы

Вирусы

В работе были использованы штаммы для аттенуированной ЖГВ A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) (Калиф17) [13] и A/17/Техас/12/30 (H3N2) (Тех17) [14], поверхностные гены которых соответствовали эпидемическим штаммам A/Калифорния/07/2009 (H1N1pdm09) (номер в базе данных NCBI: NC_026433 (HA) и NC_026434 (NA)) и A/Техас/50/2012 (H3N2) (номер в базе данных NCBI: KC892248 (HA) и KC892237 (NA)) соответственно. Для экспериментального заражения мышей использовали адаптированный к данному животным вирус гриппа A/Калифорния/07/09 (H1N1), полученный из Коллекции вирусов гриппа и ОРВИ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева [15]. Экспериментальные серии вакцинных штаммов ЖГВ A/17/Боливия/2013/6585 (H1N1), A/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 были наработаны на культуре клеток MDCK в ГНЦ ВБ «Вектор» с использованием биореакторов с объёмом культурального сосуда 2 л («Multigen») и 10 л («Biostat») [12].

Накопление вирусов в РКЭ и культуре клеток MDCK и определение инфекционного титра

Для накопления вирусов гриппа в куриных эмбрионах 10–11-дневные РКЭ заражали вирусосодержащим материалом в объеме 0,2 мл, после чего эмбрионы инкубировали в течение 48 ч при 33°C. Накопление вирусов в культуре клеток MDCK проводилось на суточном монослое с конфлюентностью 90–95%, выращенном в среде DMEM с добавлением 1×антибиотика-антимикотика (АА) («Gibco») и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) («Биолот») при 37°C в термостате с содержанием 5% CO₂. Для заражения культуры клеток MDCK готовый монослой дважды отмывали теплым раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ), после чего добавляли вирусную суспензию в объеме 1, 2, 4 мл во флаконы Т-25, Т-75 и Т-175 соответственно. После контакта в течение 1 ч при 33°C и 5% CO₂ инокулят удаляли и добавляли среду DMEM с 1×АА и 1 мкг/мл трипсина ТРСК («Sigma-Aldrich»). Через 72 ч инкубации при 33°C визуально оценивали цитопатическое действие вируса и определяли его титр в реакции гемагглютинации по стандартной методике.

Инфекционные титры вирусов в обеих системах культивирования определяли методом предельных разведений. РКЭ заражали последовательными разведениями вирусов на ФСБ в объеме 200 мкл и инкубировали при 33°C в течение 48 ч, после чего определяли наличие вируса в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. Определение титра в культуре клеток MDCK проводили на 96-луночных планшетах с суточным монослоем, при этом серийные 10-кратные разведения готовили на среде DMEM с 1×АА и 1 мкг/мл ТРСК-трипсина. После адсорбции инокулят удаляли, клетки промывали и далее инкубировали в поддерживающей среде в течение 3 сут при 33°C и 5% CO₂. Наличие вирусов в лунках определяли в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. Титры вирусов в РКЭ и культуре клеток MDCK рассчитывали по методу Рида и Менча [16] и выражали в 50% инфекционных дозах (lgЭИД₅₀/мл и lgТЦИД₅₀/мл).

Адаптация вирусов к культуре клеток MDCK

Адаптацию вирусов гриппа к культуре клеток MDCK проводили в течение 5 последовательных пассажей вируса при оптимальной множественности заражения (0,001–0,010), за которыми следовало клонирование вируса методом бляшек. Для этого на 6-луночные планшеты, засеянные накануне клетками MDCK, наносили 10-кратные разведения вирусов в 2 повторях. После часового контакта с регулярным покачиванием инокулят удаляли и в лунки вносили по 3 мл агарового покрытия, полученного смешиванием равных объемов двукратной среды DMEM (в присутствии 2×АА и 2 мкг/мл

ТРСК-трипсина) и 1,6% легкоплавкой агарозы («Lonza»). На 3–5-й день инкубации визуально определяли наличие вирусных бляшек, 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. Накопленный вирус далее подвергали полногеномному секвенированию методом Сэнгера с помощью набора «BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1» («Thermo»). В первую очередь проверяли сохранность аттенуирующих мутаций, свойственных штаммам ЖГВ, поскольку именно их наличие определяет безвредность ЖГВ и возможности ее применения [17], а затем проводили поиск мутаций в генах поверхностных белков: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА).

Работа с лабораторными животными

В экспериментах с животными использовали мышей линии СВА (Столбовая, Россия). Исследование было одобрено Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020). Для оценки иммуногенности и защитной эффективности вакцинных штаммов H1N1 были использованы самки мышей линии СВА, которых иммунизировали интраназально в дозе 10⁶ TCID₅₀ в объеме 50 мкл, двукратно с разницей в 3 нед, после чего еще через 21 день отбирали сыворотку крови для исследования уровней антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментном анализе (ИФА) по стандартной методике¹. Для исследования защитной эффективности проводили эксперимент на мышах, иммунизированных по описанной выше схеме, с последующим заражением летальным вариантом штамма А/Калифорния/07/09 (H1N1), адаптированного к мышам, в дозе 5,0 lg ЭИД₅₀ с ежедневным мониторингом выживаемости в течение 14 сут.

Для оценки кросс-реактивности антител, вырабатываемых к вакцинным штаммам ЖГВ H3N2, были получены гипериммунные крысиные сыворотки. Для этого крыс линии Вистар (Рапполово, Россия) иммунизировали 5-кратно с интервалом 5–7 дней. Первую, 3-ю и 5-ю иммунизации проводили внутривенно в объеме 5 мл/животное, 2-ю и 4-ю — с использованием полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку в объеме 1 мл/крысу, соотношение вируса и адьюванта 1 : 1. Через неделю после последней иммунизации проводили тотальный забор крови у всех иммунизированных животных. После центрифугирования крови в течение

¹ WHO. WHO Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. 2002. URL: http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/documents/docs/manualonanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf

15 мин при 3000g аккуратно отбирали сыворотку и хранили аликвоты при -20°C .

Иммунологические методы

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

Постановку ИФА с образцами мышинных сывороток осуществляли с использованием в качестве антигена очищенных на градиенте плотности сахарозы соответствующих диких вирусов гриппа. Антиген вносили в 96-луночные планшеты с высокой сорбцией («Corning») в количестве 16 агглютинирующих единиц в 50 мкл и инкубировали в течение ночи при 4°C . Планшеты промывали 3 раза отмывочным буфером (ФСБ + 0,05% Твин-20 («Биолот»)), проводили блокировку несвязанных сайтов с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина. Двукратные разведения сывороток готовили в отдельных круглодонных планшетах, которые затем переносили в лунки отмытого от блокировочного раствора планшета. После инкубации в течение 1 ч при 37°C планшеты промывали 3 раза отмывочным буфером, подсушивали и вносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, анти-IgG мыши (1 : 10 000). Инкубировали 1 ч при 37°C , 5 раз промывали планшет отмывочным буфером, подсушивали и добавляли 50 мкл/лунку субстрата ТМВ («Thermo»), который инкубировали в темноте до 20 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 . Первичные результаты ИФА учитывали на спектрофотометре («Bio-Rad») при длине волны 450 нм. Рассчитывали параметр «площадь под кривой» оптической плотности с помощью программного пакета «GraphPad Prizm v. 7».

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения «GraphPad Prizm v. 7». Для попарного сравнения титров вирусов использовали непараметрический U-тест Манна–Уитни; уровни антител между группами иммунизированных мышей сравнивали в непараметрическом однофакторном ANOVA с по-

правкой Краскела–Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Адаптация вакцинного штамма H1N1 к культуре клеток MDCK в лабораторных условиях

В результате серийного пассирования вакцинного штамма Калиф17 в культуре клеток MDCK с последующим клонированием методом бляшек получен 21 вариант вируса. Секвенирование показало сохранность всех аттенуирующих мутаций в генах внутренних и неструктурных белков. При этом лишь 2 из 21 исследованных вариантов не имели аминокислотных замен в молекуле НА, а в остальных изолятах были обнаружены мутации либо N156D в НА1, либо A44V в НА2, либо обе одновременно (табл. 1).

Расположение аминокислотных замен в молекуле НА клеточных клонов Калиф-17 представлено на рис. 1.

У 3 адаптированных к культуре клеток MDCK вариантов (Калиф17-1, Калиф17-4 и Калиф17-8) с различным набором обнаруженных мутаций были изучены ростовые характеристики в РКЭ и культуре клеток MDCK в сравнении с исходным

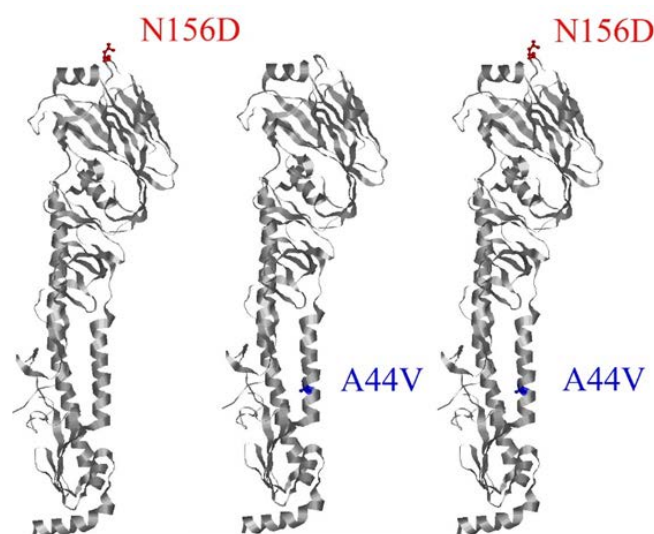


Рис. 1. Картирование адаптационных аминокислотных замен в молекуле НА вакцинного штамма Калиф17.

Расположение аминокислот показано на мономере НА A/California/04/2009 (H1N1) (PDBID: 3UYX). Иллюстрации получены с использованием программы «RasMol v. 2.7.5».

Таблица 1. Мутации, обнаруженные в молекуле НА MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Калиф17

Субъединица НА	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Калиф17	Клоны, адаптированные к MDCK		
			Калиф17-1 (9 клонов)	Калиф17-4 (7 клонов)	Калиф17-8 (3 клон)
НА1	156	Asn	Asp	Asn	Asp
НА2	44	Ala	Ala	Val	Val

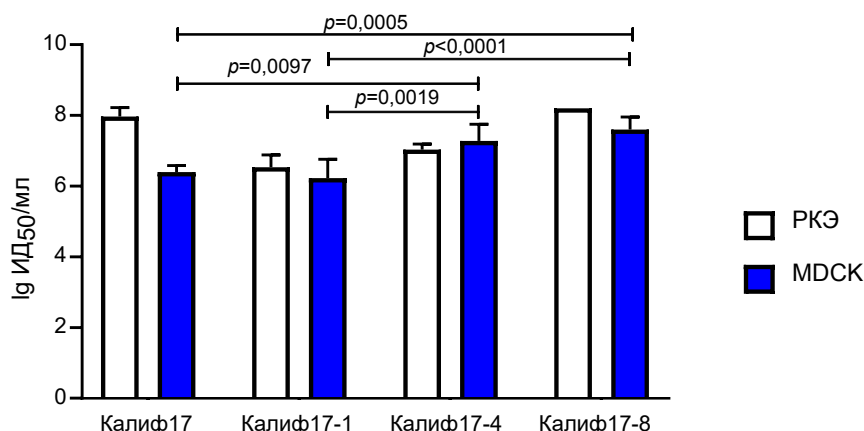


Рис. 2. Инфекционная активность вакцинного штамма ЖГВ A/17//Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) и его MDCK-адаптированных вариантов в РКЭ и культуре MDCK.

* $p < 0,05$ по сравнению с ТЦИД₅₀/мл Калиф17; † $p < 0,05$ по сравнению с ЭИД₅₀/мл Калиф17.

вирусом, накопленным в РКЭ (Калиф17). Репродукция исходного вакцинного вируса Калиф17 на различных субстратах отличалась также почти на 2 порядка: титр вируса в РКЭ составлял 8,0 lg ЭИД₅₀/мл, тогда как титр вируса в культуре клеток MDCK — 6,3 lg ТЦИД₅₀/мл (рис. 2). При исследовании MDCK-адаптированных вариантов вируса Калиф17 обнаружено достоверное увеличение титров вируса на культуре клеток MDCK более чем в 10 раз у 2 штаммов (Калиф17-4 — 7,3 lg ТЦИД₅₀/мл и Калиф17-8 — 7,6 lg ТЦИД₅₀/мл), оба содержат мутацию A44V в HA2. Вариант Калиф17-8 также со-

хранил высокий уровень репродукции в РКЭ (8,2 lg ЭИД₅₀/мл), при этом штамм Калиф17-1, имеющий только мутацию N156D в HA1, не улучшил репродукцию в культуре клеток и снизил её в РКЭ более чем в 30 раз (6,2 lg ТЦИД₅₀/мл и 6,6 log ЭИД₅₀/мл). Таким образом, мутация A44V в HA2 положительно влияет на репликацию вакцинного штамма H1N1pdm09 в обеих системах культивирования.

Изолированные после клонирования методом бляшек варианты вируса Калиф17, имеющие одну из двух мутаций, при последующем накоплении в культуре клеток MDCK приобретали обе мута-

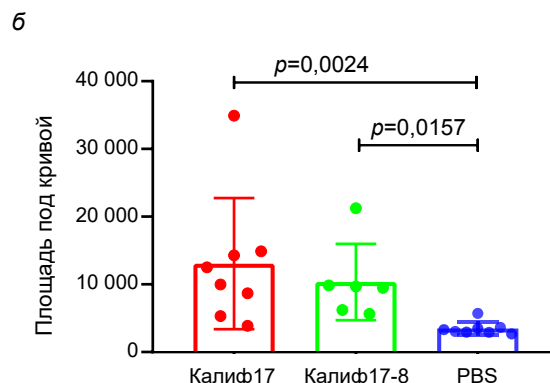
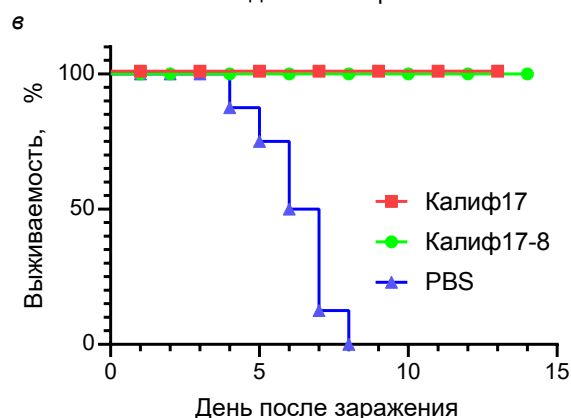
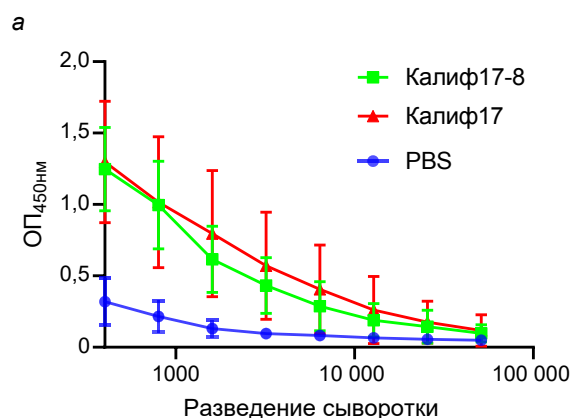


Рис. 3. Иммуногенность и протективная активность вакцинного штамма H1N1pdm09, полученного в РКЭ, и его аналога, адаптированного к культуре MDCK, в эксперименте на мышах линии СВА.

а — зависимость оптической плотности от разведения сывороток в ИФА; б — расчёт площади под кривой по данным графика а; в — уровень выживаемости иммунизированных и контрольных мышей после экспериментального заражения летальным вирусом A/Калифорния/09/07 МА. Статистическая обработка произведена методом непараметрического однофакторного ANOVA с поправкой Краскела–Уоллиса.

Таблица 2. Кросс-реактивность антител, вырабатываемых в ответ на иммунизацию мышей различными вариантами ЖГВ H1N1pdm09

Антигены	Титр антигемагглютинирующих антител в сыворотках крови мышей, привитых вариантом	
	Калиф17	Калиф17-8
Калиф-wt	640	320
Калиф17	640	320
Калиф17-8	320	320

ции — *A44V* в HA2 и *N156D* в HA1, становясь идентичными по аминокислотному составу варианту Калиф17-8. Этот феномен говорит о том, что эти две мутации сильно ассоциированы с адаптацией вируса к клеточной линии млекопитающих, но при этом исходное пятикратное пассирование не полностью заменило соответствующие аминокислоты в гетерогенной популяции вируса. Дополнительное накопление вариантов с одной мутацией на культуре клеток MDCK продолжило процесс адаптации вируса, привнося недостающую мутацию в ген HA. Таким образом, в эксперименте по иммуногенности и протективной активности вирусов на мышах была возможность сравнить только штамм Калиф17-8, несущий обе адаптационные мутации, с исходным вирусом Калиф17, накопленным в РКЭ.

На **рис. 3** представлены результаты ИФА сывороток крови иммунизированных мышей, где в качестве антигенной подложки выступал эпидемический штамм А/Калифорния/09/07 (H1N1pdm09), накопленный в РКЭ и очищенный на градиенте плотности сахарозы. Статистическая обработка данных

эксперимента показала, что значимых отличий между уровнями IgG-антител, индуцированных обоими вакцинными штаммами, нет, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния обнаруженных адаптационных мутаций *A44V* в HA2 и *N156D* в HA1 на иммуногенность ЖГВ H1N1pdm09.

Кросс-реактивность антител, индуцируемых MDCK-адаптированным вариантом Калиф17-8 и вакцинным штаммом Калиф17, оценивали в РТГА по классической методике. Адаптационные мутации не повлияли на способность продуцируемых антител связывать исходный вариант HA штамма А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) (**табл. 2**), что полностью согласуется с данными по иммуногенности, представленными выше.

Исследование влияния адаптационных мутаций *N156D* в HA1 и *A44V* в HA2 на защитную эффективность проводили с использованием «дикого» вируса А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm), адаптированного к мышам. В челлендж-эксперименте мышей, иммунизированных вакцинными штаммами Калиф17 и Калиф17-8, а также контрольную группу наивных животных заражали адаптированным к мышам летальным вирусом в дозе 10^5 IgЭИД₅₀, после чего проводили ежедневный мониторинг выживаемости в течение 14 дней. Защитная эффективность как классического штамма ЖГВ, так и его MDCK-адаптированного варианта составила 100%, тогда как животные контрольной группы погибли полностью и выживаемость в ней составила 0% (**рис. 3, в, г**). Таким образом, исследуемые MDCK-адаптационные мутации не повлияли на защит-

Таблица 3. Мутации, обнаруженные в молекуле HA MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Tex17

Субъединица HA	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Tex17	Клоны, адаптированные к культуре клеток MDCK									
			Tex17-1	Tex17-4	Tex17-8	Tex17-9	Tex17-11	Tex17-15	Tex17-16	Tex17-17	Tex17-20	Tex17-21
HA1	176	Val	Val	Val	Ile	Ile	Val	Val	Ile	Val	Val	Ile
	215	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Pro	Pro
	221	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Ser
	265	Asp	Asp	Asp	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp	Asp	Asp
	301	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg
HA2	79	Asp	Asp	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asn
	83	Tyr	His	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
	85	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
	92	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp/Gly	Trp	Trp
	124	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
	154	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Lys	Asn	Asn	Asn
	160	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	His	Asp	Asp
	169	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Lys	Asn	Asn	Asn	Asn

Примечание. Выделены адаптационные аминокислотные замены в HA по сравнению с исходным вакцинным штаммом Tex17.

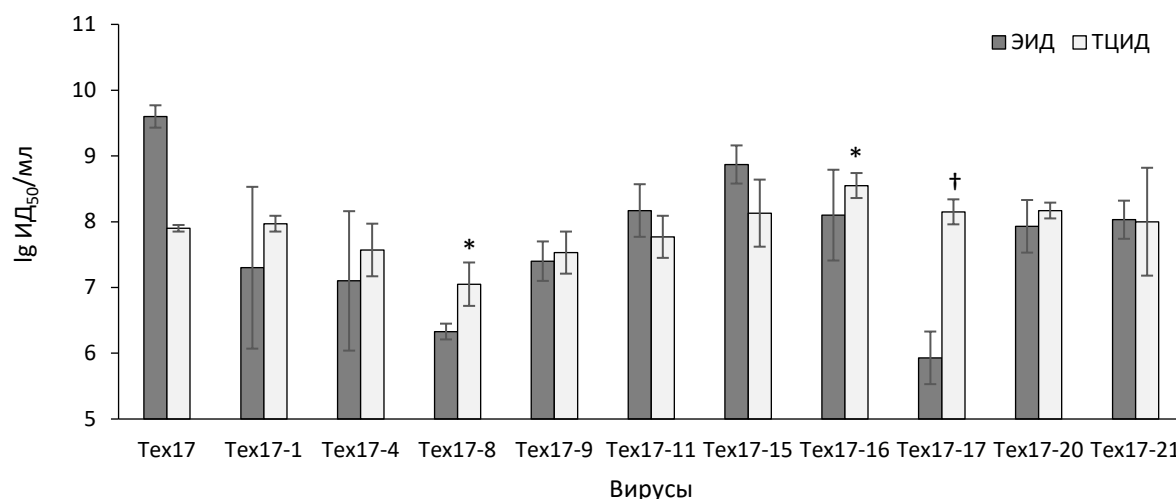


Рис. 4. Репродукция вакцинных вирусов гриппа A/17/Техас/12/30 (H3N2).
* $p < 0,05$ по сравнению с ТЦИД₅₀/мл Tex17; † $p < 0,05$ по сравнению с ЭИД₅₀/мл Tex17-17.

ную эффективность вакцинного штамма ЖГВ Калиф17.

Адаптация вакцинного штамма H3N2 к культуре клеток MDCK в лабораторных условиях

В работе был использован вакцинный штамм A/17/Техас/12/30 (H3N2) (Tex17), содержащий HA и NA от эпидемического вируса гриппа A/Техас/50/2012 (H3N2). После адаптации Tex17 к культуре клеток MDCK выделено 20 клонов Tex17, у 10 из которых при секвенировании обнаружены различные аминокислотные отличия в молекуле HA (табл. 3).

В молекуле HA MDCK-адаптированных клонов вакцинного штамма Tex17 не найдено общих мутаций, но были отмечены часто встречающиеся аминокислотные замены: V176I, P215T, P221S и D265E в HA1. Также были выявлены одиночные мутации: R301K в HA1, D79N, D79G, Y83H, E85D, W92G, K124E, N154K, D160H и N169K — в HA2 (табл. 3). Локализация часто встречающихся и одиночных мутаций различная: первые располагаются в глобулярной части HA вблизи рецептор-связывающего сайта, вторые — в ножке молекулы HA.

Исследование репродуктивной активности исследуемых вариантов показало, что исходный вакцинный штамм Tex17 в 50 раз лучше размножается в системе куриных эмбрионов, чем в культуре клеток MDCK. Интересно, что один из MDCK-адаптированных вариантов — штамм Tex17-16 — показал наиболее значимое увеличение инфекционного титра в культуре клеток MDCK по сравнению с исходным вакцинным штаммом Tex17 (рис. 4). Таким образом, набор мутаций V176I, P221S, D265E в HA1 и N154K в HA2 ассоциируется с повышением репродуктивной активности вакцинного штамма в культуре клеток MDCK.

Кроме этого, выявлен вариант Tex17-8, который имел значительно меньший титр в культуре клеток MDCK по сравнению с контрольным штаммом Tex17, на что повлияли аминокислотные замены P221S, D265E в HA1 и Y85E в HA2. Из вышесказанного следует, что мутации N154K и Y85E в HA2 являются критическими для размножения вируса в культуре клеток и требуют дальнейшего исследования. Также оказался интересен штамм Tex17-17, который в 200 раз лучше размножался в культуре клеток MDCK, чем в системе РКЭ. То есть адаптационные мутации P215T в HA1 и W92G, D160H в HA2 дали вакцинному штамму существенное преимущество для размножения в культуре клеток MDCK, что может быть эффективно использовано в производстве культуральной ЖГВ. Однако набор указанных мутаций значительно снизил репродукцию вирусов в РКЭ, и, если обратить внимание на вирусы Tex17-11 и Tex17-15, то можно заметить, что эти варианты отличаются только мутациями в субъединице HA2 молекулы HA, и именно аминокислотные различия в ножке HA являются ключевыми в адаптации вакцинных штаммов H3N2 к культуре клеток MDCK.

На рис. 5 представлены трёхмерные структуры молекул HA вакцинных штаммов Tex17-8 и Tex17-16, на которых отмечены обнаруженные адаптационные мутации. Видно, что мутации, критическим образом повлиявшие на уровень репродукции вакцинных вирусов в культуре клеток MDCK, находятся в ножке молекулы HA. Также представляет интерес исследование иммуногенности и антигенности данных вирусов, однако современные вирусы гриппа подтипа H3N2 не способны эффективно инфицировать мышей, поэтому в рамках данной работы исследование иммуногенности вирусов H3N2 в эксперименте на мышах не проводилось. Для оценки антигенности наиболее ин-

тересных MDCK-адаптированных вариантов были получены гипериммунные крысиные сыворотки.

Кросс-реактивность антител, индуцируемых клеточными клонами Tex17-8, Tex17-16 и Tex17-17, оценивали в РТГА по классической методике. Показано, что адаптационные мутации не влияли на способность продуцируемых антител связывать исходный вариант НА штамма А/Техас/50/2012 (H3N2) (табл. 4).

Адаптация вакцинных штаммов трёхвалентной ЖГВ к культуре клеток MDCK в условиях промышленного производства

В России культуральная ЖГВ разрабатывается в ГНЦ ВБ «Вектор», при этом в качестве исходного сырья используются реассортантные вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные классическим методом реассортации в РКЭ. Компания зарегистрировала систему для производства ЖГВ на культуре клеток млекопитающих и успешно произвела экспериментальную серию клеточных моновакцин против сезонных вирусов гриппа в 2015 г. [12], а затем провела клинические испытания фазы I [18]. Однако оставалось неизвестным, как повлиял процесс производства на свойства штаммов ЖГВ.

Секвенирование генов поверхностных белков НА и NA клеточных моновакцин показало, что адаптационные мутации появились только в молекулах НА вирусов гриппа А, тогда как в штамме В/60/Пхукет/2013/26 аминокислотных замен не

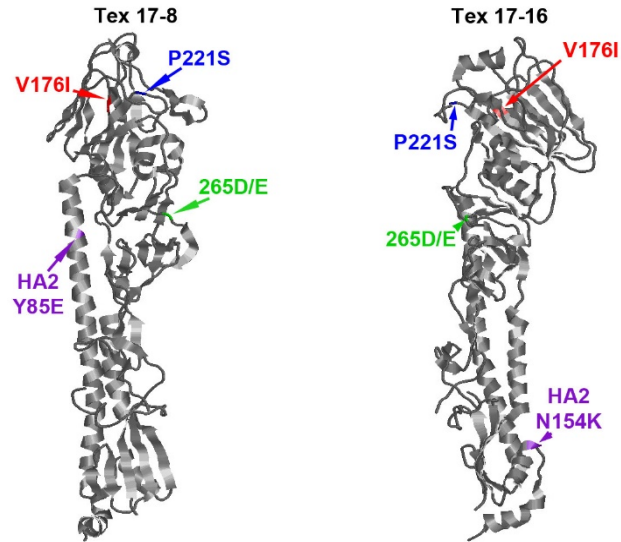


Рис. 5. Картирование адаптационных аминокислотных замен в молекуле НА вакцинного штамма Tex17. Расположение аминокислот показано на мономере НА A/Pennsylvania/14/2010 (H3N2) (PDBID: 6MZK). Иллюстрации получены с использованием программы «RasMol v. 2.7.5».

обнаружено (табл. 5). Так, в вакцинном штамме А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm09) была идентифицирована мутация *K116E* в субъединице НА2, а в штамме А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) — мутации *S219Y* и *N246K* в субъединице НА1.

На рис. 6 на мономерах соответствующих молекул НА выделены позиции, в которых были

Таблица 4. Кросс-реактивность антител в гипериммунных сыворотках крыс, полученных к различным вариантам вакцинного штамма ЖГВ H3N2

Антигены	Титр антигемагглютинирующих антител в гипериммунных сыворотках крыс, полученных к указанным вариантам вакцинного вируса			
	Tex17	Tex17-8	Tex17-16	Tex17-17
Tex-wt	1280	320	640	640
Tex17	1280	320	320	1280
Tex17-8	2560	320	320	1280
Tex17-16	640	640	640	640
Tex17-17	1280	320	640	640

Таблица 5. Аминокислотные замены в поверхностных антигенах экспериментальных клеточных моновалентных ЖГВ

Вакцина	Ген	Белок	Аминокислота	Исходный вакцинный штамм	Вакцинный штамм после производственных пассажей
А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm)	НА	НА2	116	Lys	Glu
	НА	НА		Мутаций не обнаружено	
А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2)	НА	НА1	219	Ser	Tyr
			246	Asn	Lys
	НА	НА		Мутаций не обнаружено	
В/60/Пхукет/2013/26	НА	НА		Мутаций не обнаружено	
	НА	НА		Мутаций не обнаружено	

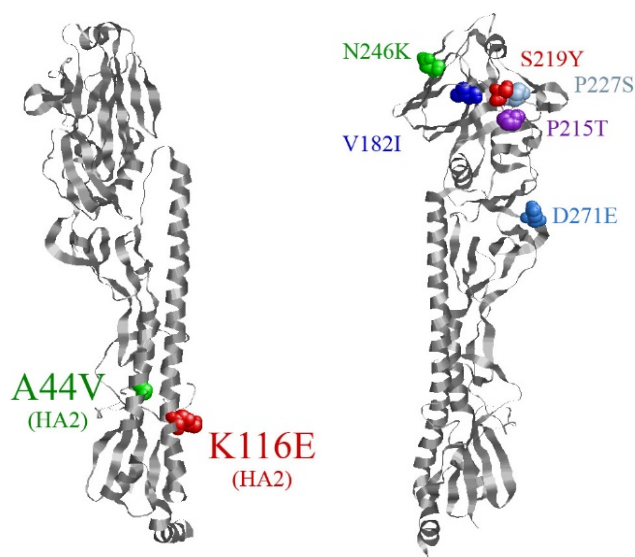


Рис. 6. Картирование адаптационных аминокислотных замен в молекуле HA вакцинных штаммов Калифорния17 и Боливия17 (а), Тех17 и Швейцария17 (б).

Расположение аминокислот показано на мономере HA A/California/04/2009 (H1N1) и A/Singapore/H2011.447/2011 (H3N2) (PDBID: 3UYX и 4WEA соответственно). Иллюстрации получены с использованием программы «RasMol v. 2.7.5».

обнаружены аминокислотные замены при адаптации вакцинных штаммов к культуре клеток в лабораторном масштабе (*A44V* в HA2 подтипа H1N1, *V176I*, *P215T*, *P221S* и *D265E* в HA1 подтипа H3N2) и в процессе производства серий культуральной ЖГВ (*K116E* в HA2 подтипа H1N1, *S219Y* и *N246K* в HA1 подтипа H3N2). Нужно отметить, что несмотря на то, что выявленные мутации не идентичны в различных вирусах, можно наблюдать их общую локализацию у каждого подтипа. Так, позиции 44 и 116 в HA2 подтипа H1N1 находятся в непосредственной близости друг от друга, позиции 176, 215, 219, 221 в HA1 подтипа H3N2 локализируются в районе рецептор-связывающего сайта.

Обсуждение

Адаптация вируса к новому кругу хозяев неизбежно влечёт за собой появление адаптационных мутаций, которые могут приводить к изменению свойств исходного вируса. При этом адаптационные мутации могут носить драматический характер, как, например, произошло при адаптации вирусов гриппа от клеток птичьего происхождения к клеткам млекопитающих, что привело к пандемиям гриппа H2N2 в 1957 г. и H3N2 в 1968 г. [19–22]. Субстрат для наработки биомассы для получения гриппозной вакцины — как живой, так и инактивированной, также может оказывать влияние на её свойства. Как уже упоминалось выше, подготовка штаммов для отечественной ЖГВ возможна только в РКЭ, при этом известны случаи появления яично-адаптационных мутаций, которые повлияли на

антигенность вакцинного штамма, что приводило к снижению эффективности вакцины при её массовом применении [21, 23–25].

Поскольку штаммы A/H3N2 являются наиболее изменчивыми и больше остальных подвержены антигенному дрейфу, это обстоятельство необходимо учитывать при наработке вакцинных вирусов в различных субстратах культивирования [21]. Так, с 2013 по 2018 г. обнаружен ряд мутаций, критически повлиявших на антигенность циркулирующих вирусов: замены *F159Y* и *K160T* в антигенном сайте В вместе с остатком N в сайте 158 способствуют приобретению дополнительного сайта гликозилирования, что активно помогало вирусу ускользать от иммунного ответа [26–28]. Затем в процессе эволюции произошла характерная аминокислотная замена *N171K*, расположенная на антигенном сайте D молекулы HA, а также замены *D122N* и *T135K* в антигенном сайте А, каждая из которых вызывает потерю N-связанных сайтов гликозилирования [29]. Следующий сезон выявил наличие замены *S144K* в молекуле HA1, которая находится в антигенном сайте, фланкирующем рецептор-связывающий сайт. Два кластера вируса гриппа H3N2 показали, что антигенно важны и замены *I58V* и *S219Y*, а также замены *I22D* и *S262N*, которые приводят к потере сайта гликозилирования [21]. В настоящем исследовании при адаптации к культуре клеток MDCK были обнаружены мутации, тоже, вероятно, находящиеся в антигенных сайтах: *V176I*, *P215T*, *P221S* и *S219Y*, однако было показано, что они не влияют на антигенность вакцинного штамма, но влияют на его способность к росту в клетках млекопитающих.

В исследованиях инфекционной активности и стабильности высокоурожайных штаммов вируса гриппа для инактивированной гриппозной вакцины продемонстрировано, что культивирование вирусов гриппа H1N1 и H3N2 в культуре клеток Vero или MDCK в подкисленных условиях сохраняет стабильность вируса, что успешно использовалось при производстве инактивированной гриппозной вакцины против птичьего гриппа H5N1. Пассирование вирусов без дополнительных условий способствовало появлению в молекуле HA2 адаптационных мутаций *N50K* (H1N1) и *D160E* (H3N2), которые улучшали рост вируса в культуре клеток, но при этом отрицательно сказывались на стабильности антигена [30]. Вирусы H3N2, накопленные в РКЭ, запускают конформационные изменения в молекуле HA в менее кислых условиях, чем их антигенно схожие первичные изоляты, и этот фенотип связывали с наличием аминокислотных замен *A138S*, *L194P* в HA1 и *D160N* в HA2, пониженной устойчивостью к кислым условиям и повышенной температуре [30]. Вероятно, отличие уровней pH при размножении в куриных эмбрионах и культуре клеток обусловило появление мутаций в районе пептида слияния

в HA2 у MDCK-адаптированных вариантов вакцинных штаммов H3N2 Tex17-8, Tex17-16, Tex17-17 и H1N1 Калиф17-8.

Интересно, что 5 мутаций в молекуле HA обнаружили только в молекуле HA1, в частности, 4 из них (*A138S*, *G218R*, *P221L* и *V223I*) находятся вблизи рецептор-связывающего сайта [31]. Мутация *N165K* локализовалась в антигенном сайте HA [31]. Замена *A138S* может возникать *in vivo* у пациентов с ослабленным иммунитетом, а также *in vitro* в культуре клеток MDCK, и было обнаружено, что она вызывает полную потерю связывания $\alpha 2,3$ -типа рецептора [32]. Мутация в позиции 218 в молекуле HA1, которая находится вблизи рецептор-связывающего сайта, была также ассоциирована со снижением аффинности к человеческому рецептору и с повышенной патогенностью на модели мышей [33, 34]. Аминокислотная замена *L194P* в HA1, превалирующая в яично-адаптированных (пассированных в куриных эмбрионах 4–5 раз) вариантах вирусов H3N2, на 3 порядка снижает связывание и нейтрализацию антителами широкого спектра действия, распознающими рецептор-связывающий сайт, а также значительно меняет антигенность молекулы HA [35]. Несмотря на то что часть обнаруженных в нашем исследовании адаптационных мутаций находится в значимых местах молекулы HA, таких как рецептор-связывающий сайт или антигенные сайты, описанные мутации не влияют на ключевые для вакцинного штамма ЖГВ показатели — не меняется антигенность MDCK-адаптированного штамма, его иммуногенность, но при этом увеличивается репликативная активность вакцинного вируса в культуре клеток, т. е. приобретает полезное свойство в контексте производства культуральной ЖГВ. При этом можно наблюдать снижение инфекционных титров MDCK-адаптированных штаммов ЖГВ в РКЭ, что является допустимым явлением при смене субстрата для культивирования вирусов. Для производства культуральной ЖГВ наиболее важна высокая репликационная активность в культуре клеток MDCK, но не в РКЭ.

Штамм вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1pdm) генетически очень похож на штамм А/Калифорния/4/2009 (H1N1pdm), но был выделен в системе РКЭ и при пассировании получил адаптационную мутацию *Q226R*, а после адаптации к мышам добавились мутации *N159D* и *K212M*. При этом вирус с мутацией *Q226R* в HA1 потерял сродство к рецепторам человеческого типа и приобрел сродство к птичьим рецепторам [36]. В обоих вирусах мутации, находящиеся непосредственно в рецептор-связывающем сайте, ожидаемо повлияли на рецепторную специфичность вируса, нарушив при этом баланс HA–NA, что повлекло снижение репродуктивной активности вируса в культуре клеток MDCK-SIAT-1. Появившиеся еще через не-

сколько пассажей в мышях мутации в молекуле HA стали компенсаторными по поверхностному заряду молекулы и при этом внесли существенный вклад в усиление патогенности исследуемых вирусов. Интересно, что данные по вкладу мутаций *D225E* и *Q226R* в HA в вирулентность пандемического вируса гриппа H1N1 на мышах были также получены корейскими учеными [37]. В других исследованиях мутацию *N159D* ассоциируют с *escape*-мутациями, которые позволяют вирусу ускользать от иммунного ответа [38].

При подготовке вакцинного штамма X-181 H1N1pdm09 в куриных эмбрионах были обнаружены мутации *N133D*, *K212T* и *Q226R* в молекуле HA1, которые привели к сильному изменению кросс-реактивности вакцинного штамма, в результате чего антитела, индуцированные вакцинным штаммом, связывались с диким типом вируса, но не нейтрализовали его [39]. Эволюционные исследования молекулы H1 показали важное значение аминокислот в позициях 156, 190 и 225 для адаптации к человеческим рецепторам и антигенному дрейфу циркулирующих вирусов H1N1 [40].

Сравнение штаммов H1N1pdm А/Калифорния/9/2007 и А/Брисбен/10/2010 показало наличие мутации *E47K* в молекуле HA2, которая влияла на стабильность тримера HA, снижала пороговое значение pH слияния мембран с 5,4 до 5,0. Установлено также, что это происходит из-за наличия межмономерного солевого мостика между аминокислотами K47 в HA2 и E21 в HA1 [41]. Кроме этого, замена *E47K* повысила термостабильность вируса и его вирулентность у хорьков, что указывает на преимущество вируса с K47 в HA2 при адаптации к эволюционным изменениям у людей [42]. Мутация *V66H* в HA2 в месте контакта двух субъединиц молекулы HA вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) влияет на сдвиг максимума pH слияния мембран в сторону более низких значений (с 5,6 до 5,1). При этом снижалась способность к репликации вируса в культуре клеток MDCK, что сопровождалось более долгим клиренсом вируса в мышах [43]. Можно заметить, что адаптационные мутации *A44V* в Калиф17-8 и *K116E* в Боливия17-М, обнаруженные в настоящем исследовании, имеют сходную локализацию с уже описанным мутациям *K47* в HA2 и *E21* в HA1. Вероятно, они могут оказывать влияние на пороговое значение pH при слиянии мембран, что является ожидаемым результатом адаптации вирусов к новому субстрату.

Исходя из полученных данных, адаптация вакцинного вируса гриппа А(H3N2) к культуре клеток MDCK привела к возникновению множественных аминокислотных замен в HA. Было показано, что мутации *N154K* и *Y85E*, обнаруженные в субъединице HA2 молекулы HA вакцинного штамма, являются критическими для размножения вируса в культуре.

Кроме этого, адаптационные мутации *W92G*, *D160H* в HA2 дают существенное преимущество репликации вакцинного вируса в культуре клеток MDCK над его репликацией в РКЭ.

Сравнение стерического расположения адаптационных мутаций между штаммами, адаптированными к клеткам MDCK в лабораторных и производственных условиях, выявило схожесть этих позиций. Так, в штамме H1N1 аминокислотные замены *A44V* (Калиф17-4) и *K116E* (Боливия17) находятся в непосредственной близости друг от друга в субъединице HA2 в ножке HA, а большинство обнаруженных адаптационных замен у штаммов H3N2 — в глобулярном домене молекулы HA1 (рис. 6). Таким образом, адаптация вакцинных штаммов ЖГВ к культуре клеток MDCK в условиях лаборатории и в производственном масштабе приводит к появлению схожих адаптационных замен у штаммов одного подтипа, при этом вирусы гриппа типа В являются максимально стабильными, а вирусы A/H1N1 приобретают адаптационные замены, необходимые для усиленной репликации вируса в данном субстрате. Штаммы A/H3N2 являются наименее стабильными, а адаптационные мутации могут захватывать и рецептор-связывающие области, что указывает на необходимость тщательного отслеживания антигенных свойств штаммов данного подтипа при их производстве на клеточном субстрате.

Заключение

В результате адаптации вакцинного штамма A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) к культуре клеток MDCK были обнаружены мутации *N156D* в HA1 и *A44V* в HA2. Исследование их влияния на репликативную активность *in vitro* показало, что наличие обеих мутаций увеличивает титр вакцинного штамма в культуре клеток MDCK на порядок, что даёт преимущества данному варианту при его наработке в производственных масштабах. Обнаруженные мутации сохранили иммуногенность, кросс-реактивность и защитную эффективность MDCK-адаптированного штамма Калиф17-8 на уровне исходного вакцинного штамма Калиф17. Таким образом, проведённые исследования показывают, что вакцинный штамм ЖГВ подтипа H1N1pdm09, полученный методом классической реассортации в РКЭ, может быть использован для производства ЖКВ на культуре клеток MDCK.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Tian Y., Ma Y., Ran J., et al. Protective impact of influenza vaccination on healthcare workers. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(11):1237. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines12111237>
2. Bouvier N.M. The future of influenza vaccines: a historical and clinical perspective. *Vaccines (Basel)*. 2018;6(3):58. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines6030058>
3. Krietsch Boerner L. The flu shot and the egg. *ACS Cent. Sci.* 2020; 6(2):89–92. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00107>
4. 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>
5. Rajaram S., Boikos C., Gelone D.K., Gandhi A. Influenza vaccines: the potential benefits of cell-culture isolation and manufacturing. *Ther. Adv. Vaccines Immunother.* 2020;8:2515135520908121. DOI: <https://doi.org/10.1177/2515135520908121>
6. McGovern I., Taylor A., Sardesai A., et al. Influenza burden averted with a cell-based quadrivalent seasonal influenza vaccine compared with egg-based quadrivalent seasonal influenza vaccine. *Expert Rev. Vaccines*. 2024;23(1):371–9. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2024.2330643>
7. Manini I., Domnich A., Amicizia D., et al. Flucelvax (Optaflu) for seasonal influenza. *Expert Rev. Vaccines*. 2015;14(6):789–804. DOI: <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1039520>
8. Shcherbik S., Pearce N., Kiseleva I., et al. Implementation of new approaches for generating conventional reassortants for live attenuated influenza vaccine based on Russian master donor viruses. *J. Virol. Methods*. 2016;227:33–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.10.009>
9. Киселева И.В., Исакова И.Н., Ларионова Н.В. и др. Эффективность получения реассортантов между эпидемическими и холодадаптированными 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>
10. Rockman S., Laurie K., Ong C., et al. Cell-based manufacturing technology increases antigenic match of influenza vaccine and results in improved effectiveness. *Vaccines (Basel)*. 2022;11(1):52. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11010052>
11. Trager G., Kembler G., Schwartz R., et al. Methods of producing influenza vaccine compositions. Patent US No. 20060153872A1;2005.
12. Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф. и др. Разработка технологии производства живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа. *Приоритетные направления развития науки и образования*. 2016;(1):85–91. Nechaeva E.A., Sen'kina T.Yu., Radaeva I.F., et al. Development of technology for the production of a live culture trivalent vaccine against seasonal influenza. *Priority Areas for the Development of Science and Education*. 2016;(1):85–91. EDN: <https://elibrary.ru/vkmwmr>
13. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Вакцинный штамм вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей. Патент РФ № 2413765 C1;2011. Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I. Vaccine strain of influenza virus A/17/California/2009/38 (H1N1) for the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent RF № 2413765 C1;2011.
14. Дубровина И.А., Ларионова Н.В., Киселева И.В. и др. Штамм вируса гриппа A/17/Техас/2012/30 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей. Патент РФ № 2563352 C2;2015. Dubrovina I.A., Larionova N.V., Kiseleva I.V., et al. Influenza virus strain A/17/Texas/2012/30 (H3N2) for the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent RF No. 2563352 C2;2015.

15. Stepanova E., Krutikova E., Wong P.F., et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of a chimeric A/B Live attenuated influenza vaccine in a mouse model. *Microorganisms*. 2021;9(2):259. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020259>
16. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27(3):493–7.
17. 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> EDN: <https://elibrary.ru/oiazzr>
18. Nechaeva E.A., Bogryantseva M.P., Ryzhikov A.B., et al. Phase I clinical trials of safety and immunogenicity of live cultural influenza vaccine vector-flu. *BMC Proc.* 2015;9(Suppl. 9):P73. DOI: <https://doi.org/10.1186/1753-6561-9-S9-P73>
19. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011158>
20. Thompson A.J., Wu N.C., Canales A., et al. Evolution of human H3N2 influenza virus receptor specificity has substantially expanded the receptor-binding domain site. *Cell Host Microbe*. 2024;32(2):261–75.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.01.003>
21. Allen J.D., Ross T.M. H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018;14(8):1840–7. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1462639>
22. Liu M., Bakker A.S., Narimatsu Y., et al. H3N2 influenza A virus gradually adapts to human-type receptor binding and entry specificity after the start of the 1968 pandemic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2023;120(31):e2304992120. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2304992120>
23. Martin E.T., Cheng C., Petrie J.G., et al. Low influenza vaccine effectiveness against A(H3N2)-associated hospitalizations in 2016–2017 and 2017–2018 of the Hospitalized Adult Influenza Vaccine Effectiveness Network (HAIVEN). *J. Infect. Dis.* 2021;223(12):2062–71. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa685>
24. Rondy M., Gherasim A., Casado I., et al. Low 2016/17 season vaccine effectiveness against hospitalised influenza A(H3N2) among elderly: awareness warranted for 2017/18 season. *Euro Surveill.* 2017;22(41):17-00645. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2017.22.41.17-00645>
25. Kissling E., Pozo F., Buda S., et al. Low 2018/19 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) among 15–64-year-olds in Europe: exploration by birth cohort. *Euro Surveill.* 2019;24(48):1900604. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.48.1900604>
26. Skowronski D.M., Sabaiduc S., Chambers C., et al. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterisation of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses. *Euro Surveill.* 2016;21(3):30112. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.3.30112>
27. Chambers B.S., Parkhouse K., Ross T.M., et al. Identification of Hemagglutinin Residues Responsible for H3N2 Antigenic Drift during the 2014–2015 Influenza Season. *Cell Rep.* 2015;12(1):1–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.005>
28. Lee H.K., Tang J.W., Kong D.H., et al. Comparison of mutation patterns in full-genome A/H3N2 influenza sequences obtained directly from clinical samples and the same samples after a single MDCK passage. *PLoS One*. 2013;8(11):e79252. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079252>
29. Melidou A., Gioula G., Exindari M., et al. Influenza A(H3N2) genetic variants in vaccinated patients in northern Greece. *J. Clin. Virol.* 2017;94:29–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.003>
30. Nakowitsch S., Waltenberger A.M., Wressnigg N., et al. Egg- or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines. *Biotechnol. J.* 2014;9(3):405–14. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201300225>
31. Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:531–69. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>
32. Kumari K., Gulati S., Smith D.F., et al. Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses. *Viol. J.* 2007;4:42. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422x-4-42>
33. Daniels P.S., Jeffries S., Yates P., et al. The receptor-binding and membrane-fusion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies. *The EMBO J.* 1987;6(5):1459–65. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02387.x>
34. Narasaraaju T., Sim M.K., Ng H.H., et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes Infect.* 2009;11(1):2–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.09.013>
35. Wu N.C., Zost S.J., Thompson A.J., et al. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine. *PLoS Pathog.* 2017;13(10):e1006682. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006682>
36. Гамбарян А.С., Ломакина Н.Ф., Боравлева Е.Ю. и др. Изменение вирулентности пандемического вируса гриппа А(Н1N1), обусловленное мутациями гемагглютинина и полимеразы. *Молекулярная биология*. 2018;52(4):644–58. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026898418040055> EDN: <https://elibrary.ru/oxkwrn>
36. Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., et al. Mutations in hemagglutinin and polymerase alter the virulence of pandemic A(H1N1) influenza virus. *Molecular Biology*. 2018;52(4):644–58. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893318040052> EDN: <https://elibrary.ru/ybidnj>
37. Kim J.I., Lee I., Park S., et al. Effects of a hemagglutinin D222G substitution on the pathogenicity of 2009 influenza A (H1N1) virus in mice. *Arch Virol.* 2014;159(10):2559–65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2104-5>
38. Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., et al. Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: variations in antigenic specificity and receptor affinity of the hemagglutinin. *Virus Res.* 2012;166(1–2):61–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.003>
39. Raymond D.D., Stewart S.M., Lee J., et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat. Med.* 2016;22(12):1465–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4223>
40. Shen J., Ma J., Wang Q. Evolutionary trends of A(H1N1) influenza virus hemagglutinin since 1918. *PLoS One*. 2009;4(11):e7789. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007789>
41. Cotter C.R., Jin H., Chen Z. A single amino acid in the stalk region of the H1N1pdm influenza virus HA protein affects viral fusion, stability and infectivity. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003831. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003831>
42. Yang H., Chang J.C., Guo Z., et al. Structural stability of influenza A(H1N1)pdm09 virus hemagglutinins. *J. Virol.* 2014;88(9):4828–38. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02278-13>
43. Jakubcová L., Vozárová M., Holý J., et al. Biological properties of influenza A virus mutants with amino acid substitutions in the HA2 glycoprotein of the HA1/HA2 interaction region. *J. Gen. Virol.* 2019;100(9):1282–92. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001305>

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, matyushenko@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>

Степанова Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук., в. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, fedorova.iem@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

Руденко Лариса Георгиевна — д-р мед. наук, профессор, г. н. с. лаб. иммунологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций, 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, зам. директора Института экспериментальной медицины по науке, 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, экспериментов с животными, анализ данных мировой литературы, подготовка текста статьи; Костромитина А.Д. — подготовка и проведение иммунологических исследований, проведение экспериментов с животными; Степанова Е.А. — анализ данных мировой литературы, работа с базами данных, визуализация молекулярных структур; 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, редактирование и рецензирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025;
принята к публикации 28.05.2025;
опубликована 28.06.2025

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, matyushenko@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>

Ekaterina A. Stepanova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, fedorova.iem@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

Larisa G. Rudenko — Dr. Sci. (Med.), Professor, main researcher, Laboratory of immunology and vaccine prevention of viral infections, Head, 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, Deputy director for science, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, isakova.sivak@iemspb.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>

Authors' contribution: Matyushenko V.A. — the idea and development of the concept of the article, preparation and conduction of virological and immunological studies, experiments with animals, analysis of world literature data, preparation of the text of the article; Kostromitina A.D. — preparation and conduction of immunological studies, experiments with animals; Stepanova E.A. — analysis of world literature data, work with databases, visualization of molecular structures; Rudenko L.G. — the idea and development of the concept of the article, writing the text of the article, final approval of the version for publication; Isakova-Sivak I.N. — the idea and development of the concept of the article, the general management of the project, writing the article, editing and reviewing 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 20.03.2025;
accepted for publication 28.05.2025;
published 28.06.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-665>



Встречаемость и генотипирование возбудителей клещевых инфекций в иксодовых клещах на востоке Западной Сибири (Россия, 2023 г.)

Ильинских Е.Н.^{1#}, Карпова М.Р.^{1✉}, Воронкова О.В.¹, Решетова А.В.¹, Филатова Е.Н.¹,
Карташов М.Ю.^{2#}, Кривошеина Е.И.², Беличенко К.Р.², Терновой В.А.², Локтев В.Б.^{2,3✉}

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

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

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Аннотация

Введение. Томская область относится к регионам РФ с максимально высоким уровнем заболеваемости населения клещевыми инфекциями. Однако спектр и генетическое разнообразие возбудителей клещевых инфекций изучены недостаточно.

Цель исследования — оценить встречаемость и провести генотипирование различных видов возбудителей клещевых инфекций в иксодовых клещах, собранных с растительности в городских и пригородных биотопах г. Томска.

Материалы и методы. В исследовании проанализированы 534 клеща: *Ixodes persulcatus* ($n = 107$), *I. pavlovskyi* ($n = 234$) и *Dermacentor reticulatus* ($n = 193$), собранных в 13 биотопах Томска и в биотопах пригородов в течение 2023 г. Детекция генетического материала клещевых патогенов проведена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР с обратной транскрипцией в индивидуальных клещах с последующим секвенированием и филогенетическим анализом нуклеотидных последовательностей.

Результаты. Обнаружено более чем четырехкратное доминирование клещей *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus* над таёжным клещом. При этом инфицированность клещей *I. persulcatus* вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) сибирского генотипа составила 1,3%, в клещах рода *Ixodes* генетический материал *Borrelia burgdorferi* s.l. был обнаружен в 8,5%, *B. miyamotoi* — 2,1%, *Anaplasma phagocytophilum* — 1,5%, а *Rickettsia tarasevichiae* — 14,1%. Инфицированность *R. raoultii* клещей *D. reticulatus* составила 48,7%, а в единичном образце была обнаружена ДНК *Babesia canis*. Генотипирование и филогенетический анализ геномных нуклеотидных последовательностей показал наличие новых, необычных для региона геновариантов *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii* и сибирского генотипа ВКЭ (субклайд V).

Заключение. На территории Томска и его пригородов в иксодовых клещах обнаружен генетический материал 9 видов клещевых патогенов, в том числе их новые генетические варианты.

Ключевые слова: иксодовые клещи, вирус клещевого энцефалита, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., генотипирование, Томск, Россия

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-15-20010, <https://rscf.ru/project/22-15-20010/> и средств Администрации Томской области, а также в рамках выполнения государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГЗ-7/21).

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

Для цитирования: Ильинских Е.Н., Карпова М.Р., Воронкова О.В., Решетова А.В., Филатова Е.Н., Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Беличенко К.Р., Терновой В.А., Локтев В.Б. Встречаемость и генотипирование возбудителей клещевых инфекций в иксодовых клещах на востоке Западной Сибири (Россия, 2023 г.). *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):310–324.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-665>

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

[#]Авторы внесли равный вклад в исследование.

© Ильинских Е.Н., Карпова М.Р., Воронкова О.В., Решетова А.В., Филатова Е.Н., Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Беличенко К.Р., Терновой В.А., Локтев В.Б., 2025

Surveillance and genotyping of tick-borne pathogens in ixodid ticks in the east of Western Siberia (Russia, 2023)

Ekaterina N. Ilyinskikh^{1#}, Maria R. Karpova^{1✉}, Olga V. Voronkova¹, Alina V. Reshetova¹, Evgenia N. Filatova¹, Mikhail Yu. Kartashov^{2#}, Ekaterina I. Krivosheina², Ksenia R. Belichenko², Vladimir A. Ternovoi², Valery B. Loktev^{2,3✉}

¹Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia, Tomsk, Russia;

²State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia;

³Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract

Introduction. Tomsk region is one of the territories of the Russian Federation with the highest possible incidence of tick-borne infections. However, the spectrum and genetic diversity of tick-borne pathogens remain insufficiently studied.

Materials and methods. The study analyzed 534 ticks: *Ixodes persulcatus* ($n = 107$), *I. pavlovskyi* ($n = 234$) and *Dermacentor reticulatus* ($n = 193$), collected in 13 biotopes of Tomsk and its suburbs during 2023. Detection of genetic material of tick-borne pathogens was carried out by PCR and RT-PCR in individual ticks with subsequent sequencing and phylogenetic analysis of nucleotide sequences.

Results. More than fourfold dominance of *I. pavlovskyi* and *D. reticulatus* ticks over the taiga tick was observed. Infection of *I. persulcatus* ticks with tick-borne encephalitis virus (TBEV) of the Siberian genotype amounted to 1.3%, in ticks of the *Ixodes* genus, the genetic material of *Borrelia burgdorferi* s.l. was detected in 8.5%, *B. miyamotoi* – in 2.1%, *Anaplasma phagocytophilum* — in 1.5%, and *Rickettsia tarasevichiae* — in 14.1%. *R. raoultii* infection of *D. reticulatus* ticks was identified in 48.7%, and *Babesia canis* DNA was detected in a single sample. Genotyping and phylogenetic analysis of genomic nucleotide sequences showed the presence of new, unusual for the region genetic variants of *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii* and the Siberian TBEV genotype (subclade V).

Conclusion. In the territory of Tomsk and its suburbs, genetic material of 9 species of tick-borne pathogens, including their new genetic variants, was detected in ixodes ticks.

Keywords: ixodes ticks, tick-borne encephalitis virus, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., genotyping, Tomsk, Russia

Funding source. The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 22-15-20010, <https://rscf.ru/project/22-15-20010/> and funds of the Administration of the Tomsk region, as well as within the framework of the state assignment of the SSC World Bank "Vector" Rospotrebnadzor (GZ-7/21).

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

For citation: Ilyinskikh E.N., Karpova M.R., Voronkova O.V., Reshetova A.V., Filatova E.N., Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Belichenko K.R., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Surveillance and genotyping of tick-borne pathogens in ixodid ticks in the east of Western Siberia (Russia, 2023). *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):310–324.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-665>

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

Введение

Иксодовые клещи являются переносчиками ряда возбудителей инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной и протозойной природы, играющих большую роль в инфекционной патологии человека. Томская область относится к территориям России с наиболее высокими показателями заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ) и клещевым энцефалитом [1–4]. В 2020–2023 гг. показатели заболеваемости превышали средние показатели заболеваемости по России в 2,0–5,9 раза,

составляя 10,3–15,7 на 100 тыс. населения для ИКБ, и в 4,0 и более раз, варьируя от 2,9 до 4,5 на 100 тыс. населения, для клещевого энцефалита. При этом количество обращений населения в медицинские организации региона за медицинской помощью по поводу присасывания клеща составило более 1000 на 100 тыс. населения в 2020–2023 гг.¹ В указанный период этот показатель варьировал от 1705,5 до 2390,1

¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.; 2023. 368 с.

[#]The authors have made equal contributions to the study.

© Ilyinskikh E.N., Karpova M.R., Voronkova O.V., Reshetova A.V., Filatova E.N., Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Belichenko K.R., Ternovoi V.A., Loktev V.B., 2025

на 100 тыс. населения, превышая соответствующие средние значения параметра в России от 5,0 до 7,4 раза.

В целом, в распространении клещевых инфекций в России участвуют несколько видов клещей, при этом наибольшее значение имеют клещи *Ixodes ricinus* и *I. persulcatus* [5]. В Западной Сибири описано не менее 11 видов иксодовых клещей, из которых наибольшую эпидемическую значимость имеет клещ *I. persulcatus* [6–8]. Традиционно таёжный клещ считается основным вектором для клещевых патогенов на юге Западной Сибири, однако в последнее время в городских и пригородных биотопах Томска необычно широкое распространение получили клещи *I. pavlovskyi* (Pomerantzev, 1946) и *D. reticulatus* (Fabricius, 1794) [8, 9]. Известно, что клещи рода *Dermacentor*, преобладающие в степных и лесостепных зонах Сибири, могут быть переносчиками вируса омской геморрагической лихорадки, риккетсий клещевого сыпного тифа Северной Азии, а также возбудителей лихорадки Ку и гранулоцитарного анаплазмоза человека [2, 3, 7, 8]. Средняя численность иксодовых клещей на территории пригородов Томска и г. Томска варьировала от 26,5 до 57,7 экземпляров на 1 км маршрута [4]. Результаты изучения вирусофорности клещей методами иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции варьировала от 0,6% до 6,1%. Заражённость вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) для клещей рода *Ixodes* составила 6,5%, а для рода *Dermacentor* — 1,9% [4].

Исследование видового состава иксодовых клещей в городской черте Томска, проведённое в 2015–2016 гг., показало значительный рост численности *D. reticulatus* на склонах высокого берега р. Томь (район Лагерного сада), достигая 66 особей на 1 км маршрута. Ранее, в 2012–2014 гг., средняя сезонная численность составляла всего 0,17 экземпляров на 1 км маршрута [7, 8]. В 2018–2021 гг. максимальная численность клещей рода *Dermacentor* достигала 20 особей на 1 учётный км. В 2015 г. исследование показало, что из числа отловленных с растительности в пригородах Томска клещей рода *Ixodes* доля *I. pavlovskyi* составила 70,3%, а доля *I. persulcatus* — 29,7%. Средняя сезонная численность *I. persulcatus* составила 3,67 особи, а *I. pavlovskyi* — 8,42 экземпляра на 1 учётный км соответственно [7, 8].

Недавно существенное доминирование *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus* среди клещей, атакующих человека, было также описано в Новосибирске и его пригородах [6]. При этом в других сибирских регионах подобный факт пока не описан и в них таёжный клещ по-прежнему ассоциируется с распространением клещевых инфекций у населения.

Инфицированность иксодовых клещей на юге Западной Сибири различными возбудителями вирусной, бактериальной и протозойной природы

остаётся недостаточно исследованной. При этом растёт количество публикаций о широком спектре клещевых патогенов, обнаруженных в различных видах клещей на территориях Северное Евразии [6, 10, 11]. Для восполнения и обновления данных по молекулярной эпидемиологии возбудителей клещевых инфекций в условиях крупного сибирского мегаполиса была предпринята попытка определения уровней инфицированности различных видов иксодовых клещей в городских и пригородных биотопах Томска в течение одного летнего сезона. Детекцию генетического материала возбудителей различных клещевых инфекций, включая ВКЭ, орбивирусы (вирус Кемерово), *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. и *Babesia canis*, проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для каждого клеща индивидуально с последующим секвенированием обнаруженного генетического материала и генотипированием выявленных патогенов.

Материалы и методы

В ходе исследования было собрано и проанализировано 534 индивидуальных особи клещей, относящихся к следующим видам: *I. persulcatus* ($n = 107$), *I. pavlovskyi* ($n = 234$) и *D. reticulatus* ($n = 193$). Сбор клещей проводился стандартным методом с растительности на территории 13 городских и пригородных биотопов Томска (рис. 1) в летний период 2023 г. Видовую идентификацию клещей осуществляли, как описано ранее [6].

Для выделения нуклеиновых кислот клещи были дважды обработаны 70% этиловым спиртом и промыты фосфатно-солевым буфером для удаления внешних загрязнений и наружной микрофлоры. Гомогенизацию полученных образцов осуществляли с использованием лабораторного гомогенизатора «TissueLyserLT» («Qiagen») в 300 мкл стерильного физиологического раствора. Выделение суммарных нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл гомогената с использованием набора реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» («НекстБио») согласно инструкции производителя. Комплементарную ДНК получали в реакции ОТ с помощью коммерческого набора «РЕВЕРТА-Л» «АмплиСенс»).

С целью контроля этапа выделения нуклеиновой кислоты, а также её сохранности при хранении со всеми изучаемыми образцами была проведена ПЦР на выявление участка гена цитохромоксидазы субъединицы I, локализованного в митохондриальном геноме клещей. Для этого были использованы пары праймеров IpCX-6f/IpCX-9R для клещей рода *Ixodes* и DH_f/DH_r для клещей рода *Dermacentor*.

Скрининг проб на наличие генетического материала изучаемых патогенов (ВКЭ, вирус Кемерово, *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, *Rickettsia* spp.,

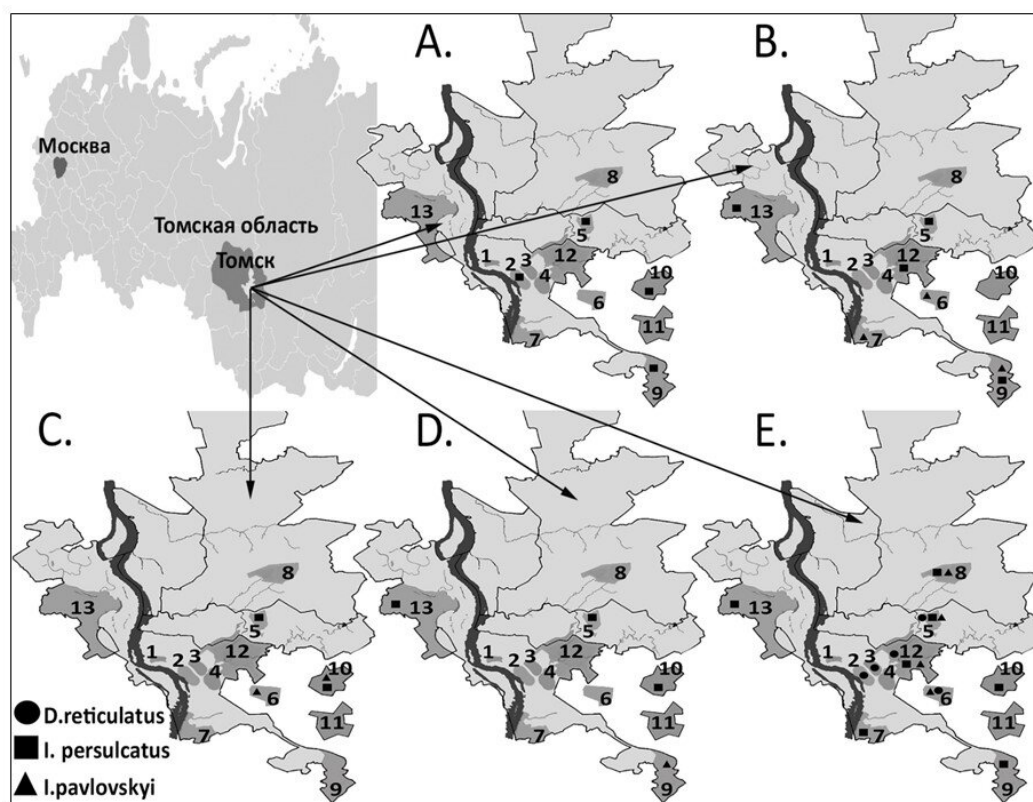


Рис. 1. Карта-схема Томска и пригородов с обозначением районов сбора клещей.

A — места выявления РНК ВКЭ; B — ДНК *B. burgdorferi* s.l.; C — ДНК *B. miyamotoi*; D — ДНК *A. phagocytophilum*; E — ДНК *Rickettsia* spp.

Обозначение районов сбора: 1 — Лагерный сад; 2 — стадион «Буревестник»; 3 — кладбище «Южное»; 4 — гаражный кооператив на ул. Континентальная; 5 — микрорайон «Академгородок»; 6 — лес около п. Зональная станция; 7 — микрорайон Аникино; 8 — лесополоса на Иркутском тракте; 9 — д. Лоскутово; 10 — с. Межениновка; 11 — п. Басандайка; 12 — п. Степановка; 13 — с. Тимирязевское.

A. phagocytophilum, *Babesia* spp.) проводили методом ПЦР с последующей электрофоретической детекцией или ОТ-ПЦР. Постановку ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси с использованием набора «БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×)» («Биолабмикс») и 0,4 pM специфических олигонуклеотидных праймеров (табл. 1). Для проведения таргетной ПЦР и наработки ампликонов, предназначенных для полногеномного секвенирования изолятов ВКЭ, была использована Фьюжн ДНК-полимераза Pfu-Sso7d («Биолабмикс»). Доверительный 95% интервал (ДИ) уровня инфицированности клещей изучаемыми патогенами рассчитывали с использованием онлайн-сервиса².

Анализ продуктов амплификации выполняли посредством разделения фрагментов ДНК в 2% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, содержащем 0,1% бромистого этидия. Очистку ампликонов из агарозного геля для последующей постановки секвенирующей реакции проводили с использованием набора на основе микроколонок («Биосилика»).

Постановку реакции секвенирования методом

Сенгера проводили с использованием набора реагентов для циклического секвенирования «Big Dye Terminator Kit v. 3.1» («Thermo Fisher Scientific»). Определение нуклеотидных последовательностей проводили по обоим цепям с помощью автоматического секвенатора «3130xl Genetic Analyzer» («Applied Biosystems»), все нуклеотидные последовательности были определены дважды в независимых экспериментах. Полногеномное секвенирование выявленных изолятов ВКЭ было выполнено с применением технологии MiSeq с соответствующими наборами «MiSeq reagent kits v2» («Illumina») путём анализа перекрывающихся специфических фрагментов после проведения ПЦР. Сборку последовательностей выполняли методом картирования прочтений на референс-геном штамма Заусаев (AF527415) с определением контигов с использованием программы «Geneious Prime (2024.0.5)».

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей, выравнивания и проведение филогенетического анализа проводили с использованием программных продуктов «Unipro UGENE v. 1.50» [16] и «MEGA X» [17]. Построение филогенетических деревьев выполняли методом максимального правдоподобия и эволюционной модели Тамуры–

² URL: <https://www.pedro.org.au/english/downloads/confidence-interval-calculator>

Таблица 1. Праймеры, использованные для выделения фрагментов генов вирусов боррелий, риккетсий и анаплазм из иксодовых клещей

Мишень	Праймеры	Структура праймера (5'→3')	Размер	Источник
<i>Ixodes</i> sp.	IpCX-6f	ATTAGGAGCACCTGATATAGCTTTCCC	660	
	IpCX-9r	GCTGTAAATAAGCTCGAGTGTGCGATA		
<i>D. reticulatus</i>	DH_f	TCGAWTAGAAYTAAGACAACCTGG	610	[6]
	DH_r	GGTGRCCAAAAAATCAAAATARATG		
TBEV	Kgg31	AAAGGCAGCATTGTGACCTG	361	[11]
	Kgg19	CGTGTCTCCACGGCAGAGCC		
ALSV	Miass_gly_3F	TGGATCAGCTCACACCACAC	333	
	Miass_gly_3R	TCACCGTCACAGTGAATGG		
YGTV	YGTV_gly_1F	ACTACTGGTTGCCGCTCCTCG		
	YGTV_gly_1R	GTCGCTGCAGTCAAATATCT		
Kemerovo	rt_Kem4f	TCCGCCACCCTGGAATGAGAC	116	[9, 12]
	rt_Kem4r	TCAGGATCGGTCAAGGCCATTC		
	Kem_prb4	FAM-AGCCGTTTCTGTCCACGAGACG-BHQ1		
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	F7	TTCAAAGGGATACTGTTAGAGAG		[13]
	F10	AAGAAGGCTTATCTAATGGTGATG		
	F5	ACCTGGTGATGTAAGTTCTCC		
	F12	CTAACCTCATTGTTGTTAGACTT		
<i>B. miyamotoi</i>	Q1	CACCATTGATCATAGCTCACAG		[13]
	Q4	CTGTTGGTGCTTCATTCCAGTC		
	Q3	GCTAGTGGGTATCTTCCAGAAC		
	Q2	CTTGTTGTTTATGCCAGAAGGGT		
<i>Rickettsia</i> spp.	PrF_gltA	GGCTTCGGTCATCGTGT	120	[14]
	PrR_gltA	TTGCTATTTGTAAGAGCGGATTG		
	Z(ROX)_gltA	ROX-CCACGTGCCGCACTTAAAGAAAC-BHQ2	765	[15]
	CS409d	CCTATGGCTATTATGCTTGC		
	RP1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		
<i>A. phagocytophilum</i>	MSP2- 3f	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	334	[13]
	MSP2- 3r	GCCCAGTAACAACATCATAAGC		

Нея (TN93). Статистическую значимость топологии филогенетических деревьев оценивали методом Bootstrap-анализа, вычисления проводили для 500 псевдобыборок.

Нуклеотидные последовательности, выявленные в данной работе, были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами: PP942931–PP942934 для полногеномных последовательностей ВКЭ, PQ126376–PQ126404 для фрагментов гена *P83/100* *B. burgdorferi* s.l., PQ126405–PQ126411 для фрагментов гена *glpQ* *B. miyamotoi*, PQ126412–PQ126416 для фрагментов гена *msp2* *A. phagocytophilum*, PQ123220 для фрагмента гена обнаруженного изолята *B. canis*.

Исследования проводили с соблюдением

правил биобезопасности, регламентированных в СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» от 28.01.2021.

Результаты

Из 534 изученных иксодовых клещей *I. persulcatus* были представлены 107 (20,0%) особями (56 самок и 51 самец), *I. pavlovskyi* — 234 (43,8%; 133 самки и 101 самец), *D. reticulatus* — 193 (36,1%; 120 самок и 73 самца). Все клещи были исследованы методом ПЦР на наличие генетического материала 10 видов клещевых патогенов вирусной, бактериальной и протозойной этиологии (вирус Кемерово, ВКЭ, *B. garinii*, *B. afzelii*,

Таблица 2. Выявление маркеров возбудителей клещевых инфекций в клещах *D. reticulatus*, *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*

Маркеры	Количество ПЦР-положительных образцов в иксодовых клещах, абс./% (95% ДИ)			
	клещи рода <i>Ixodes</i> , всего (n = 341)	<i>I. persulcatus</i> (n = 107)	<i>I. pavlovskyi</i> (n = 234)	<i>D. reticulatus</i> (n = 193)
РНК ВКЭ	4/1,3 (0,3–2,6)	4/1,3 (0,3–2,6)	0	0
ДНК <i>R. tarasevichiae</i> / <i>R. raoultii</i>	48/14,1 (10,8–18,2)	43/40,2 (31,4–49,7)	5/2,1 (0,9–4,9)	94/48,7 (41,8–55,8)
ДНК <i>A. phagocytophilum</i>	5/1,5 (0,6–3,4)	4/3,7% (1,5–9,2)	1/0,4 (0,1–2,4)	0
ДНК <i>B. canis</i>	0	0	0	1/0,5 (0,1–2,9)
ДНК <i>B. miyamotoi</i>	7/2,1 (1,0–4,2)	3/2,8 (0,9–7,9)	4/1,7 (0,6–4,3)	0
ДНК <i>B. burgdorferi</i> s.l.	29/8,5 (5,9–11,9)	17/15,9 (10,2–23,9)	12/5,1 (2,9–8,7)	0
В том числе (n = 29):				
<i>B. garinii</i>	19/65,5 (47,4–80,1)	9/8,4 (4,5–15,2)	10/4,3 (2,3–7,7)	0
<i>B. afzelii</i>	7/24,1 (12,2–42,1)	5/4,7 (2,0–10,5)	2/0,8 (0,2–3,0)	0
<i>B. bavariensis</i>	3/10,4 (3,6–26,3)	3/2,8 (0,9–7,9)	0	0

B. bavariensis, *B. miyamotoi*, *R. tarasevichiae*, *R. raoultii*, *A. phagocytophilum* и *B. canis*) (табл. 2). Вирус Кемерово нами не выявлен.

РНК ВКЭ была обнаружена в 4 (1,3%; 95% ДИ 0,3–2,6) особях из 341 клеща рода *Ixodes*. Все выявленные изоляты ВКЭ при анализе полноразмерной нуклеотидной последовательности генома были отнесены к сибирскому генотипу. Они характеризовались высоким уровнем гомологии нуклеотидной последовательности вирусного генома, который составляет 94–98% в сравнении другими штаммами сибирского генотипа и около 85–86% — с другими генотипами ВКЭ (табл. 3). Уровни гомологии ами-

нокислотной последовательности вирусного полипротеина составляют около 98–99 и 94–95% соответственно. Изолят Tomsk 2-2023 отличается более низким уровнем гомологии от трех других секвенированных томских изолятов.

При проведении филогенетического анализа выявленные генетические варианты кластеризуются с субкладой V сибирского генотипа ВКЭ [18]. Обнаруженные изоляты ВКЭ имеют высокий уровень гомологии и кластеризуются вместе с вариантами ВКЭ, циркулирующими в южных регионах Сибири, включая регионы, прилегающие к озеру Байкал (рис. 2). При этом изолят Tomsk 2-2023

Таблица 3. Степень идентичности (%) нуклеотидной (нук.) и аминокислотной последовательностей полипротеина (аа.) выявленных вариантов ВКЭ по сравнению с прототипными штаммами ВКЭ

Прототипные штаммы	Tomsk 1-2023 (PP942931)		Tomsk 2-2023 (PP942932)		Tomsk 3-2023 (PP942933)		Tomsk 4-2023 (PP942934)	
	нук.	аа.	нук.	аа.	нук.	аа.	нук.	аа.
Сибирский генотип ВКЭ								
Lesopark 11 (KJ701416)	98,14	99,45	96,62	98,99	98,20	99,23	98,27	99,39
Zausaev (AF527415)	98,31	99,42	96,50	99,08	98,06	99,39	98,09	99,48
Kolarovo-2008 (FJ968751)	93,98	96,47	94,06	96,47	94,02	96,47	94,22	96,57
Tomsk-PT122 (KM019545)	94,16	98,31	94,47	98,28	94,24	98,28	94,42	98,41
Vasilchenko (AF069066)	94,23	98,31	94,55	98,25	94,38	98,28	94,58	98,44
Дальневосточный генотип ВКЭ								
Sofjin-HO (AB062064)	85,66	95,34	85,52	95,37	85,64	95,40	85,51	95,43
205 (DQ989336)	85,48	95,22	85,51	95,31	85,52	95,28	85,52	95,31
Западный генотип ВКЭ								
Hypr (U39292)	85,24	94,88	85,16	94,94	85,34	94,91	85,21	94,79
Neudoerfl (U27495)	85,21	94,39	85,15	94,39	85,26	94,42	85,14	94,33
Байкальский генотип ВКЭ								
886-84 (EF469662)	84,97	95,65	84,92	95,71	84,97	95,61	85,11	95,77
178-79 (EF469661)	85,80	95,92	85,80	96,01	85,86	95,89	85,88	96,04

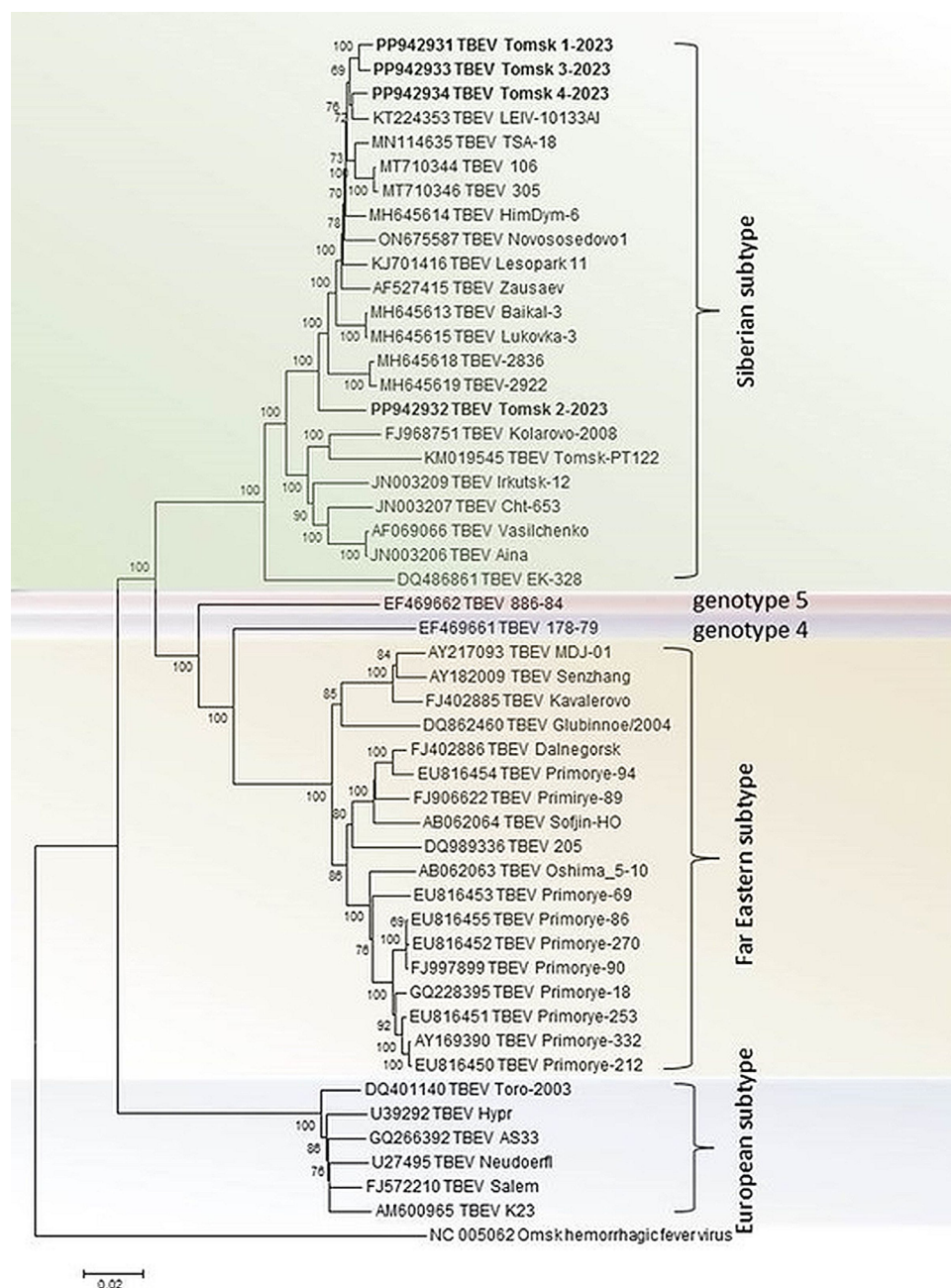


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по полногеномным нуклеотидным последовательностям ВКЭ.

Секвенированные варианты ВКЭ выделены жирным шрифтом. Формат представления: номер депонирования GenBank, название изолята.

формирует отдельную филогенетическую ветвь, которая может быть перспективной на выделение в отдельный субклайд внутри сибирского генотипа ВКЭ. Филогенетический анализ показывает, что все геномные последовательности томских изолятов 2023 г. являются оригинальными и отличаются от циркулирующих в 2006–2008 гг. в Томске изолятов Kolarovo-2008 и Tomsk-PT122, относящихся к субкладе IV сибирского генотипа ВКЭ.

В 29 клещах рода *Ixodes* была обнаружена ДНК *B. burgdorferi* комплекса s.l., что соответствует уровню инфицированности 8,5% (95% ДИ 5,9–11,9;

табл. 2). Генотипирование по нуклеотидной последовательности фрагмента гена *P83/100* показало, что видовое разнообразие боррелий было представлено в основном *B. garinii* — 65,5% случаев, *B. afzelii* была обнаружена в 24,1% случаев, а *B. bavariensis* — в 10,4%. Результаты филогенетического анализа этих 3 видов боррелий представлены на **рис. 3**. Все секвенированные варианты *B. burgdorferi* s.l. на филогенетическом дереве формировали компактные монофилетические группы в пределах своего вида, которые группировались с ранее выделенными изолятами в северной

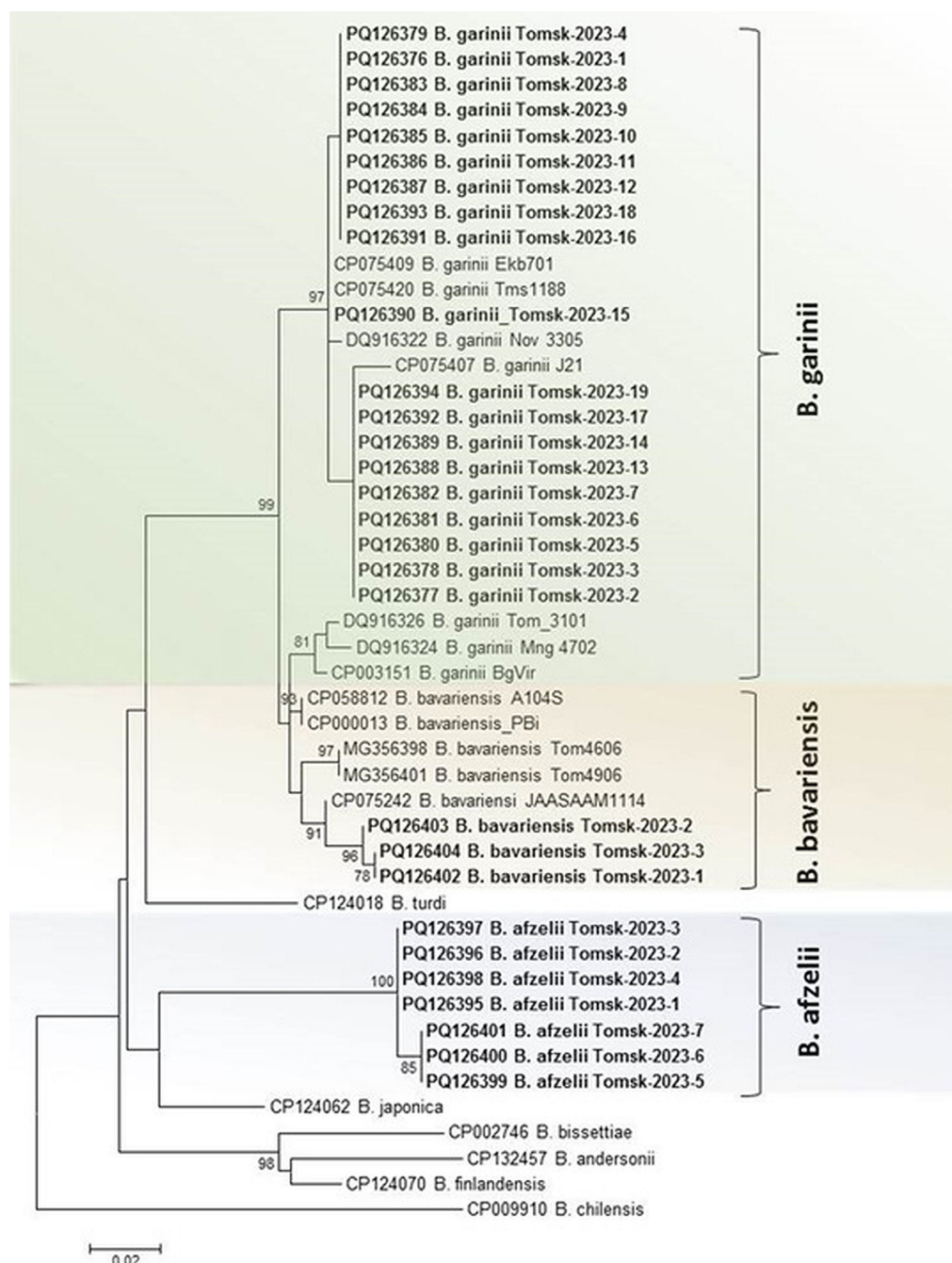


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по фрагменту гена *P83/100* (325 п.н.) выявленных изолятов *B. burgdorferi* комплекса s.l.

Евразии.

В 7 клещах рода *Ixodes* также была выявлена ДНК *B. miyamotoi* на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена глицерофосфодиэстерфосфодиэстеразы (*glpQ*), что соответствует уровню инфицированности 2,1% (95% ДИ 1,0–4,2; табл. 2). При этом в иксодовых клещах рода *Dermacentor* ДНК комплекса *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* не обнаружена.

Филогенетический анализ для обнаруженных изолятов *B. miyamotoi* показал, что все они имеют высокий уровень идентичности с вариантами, об-

наруженными ранее на территории Томской, Новосибирской областей, Хабаровского и Красноярского краёв, и вместе с ними кластеризуются в пределах Азиатского субтипа *B. miyamotoi* (рис. 4).

В 4 клещах *I. persulcatus* и 1 клеще *I. pavlovskyi* выявлена ДНК *A. phagocytophilum* (табл. 2). Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена *major surface protein 2* (*msp2*) было выполнено для обнаруженных изолятов *A. phagocytophilum*, и результаты их филогенетического анализа представлены на рис. 5. Все секвенированные изоляты *A. phagocytophilum* формируют монофилетическую

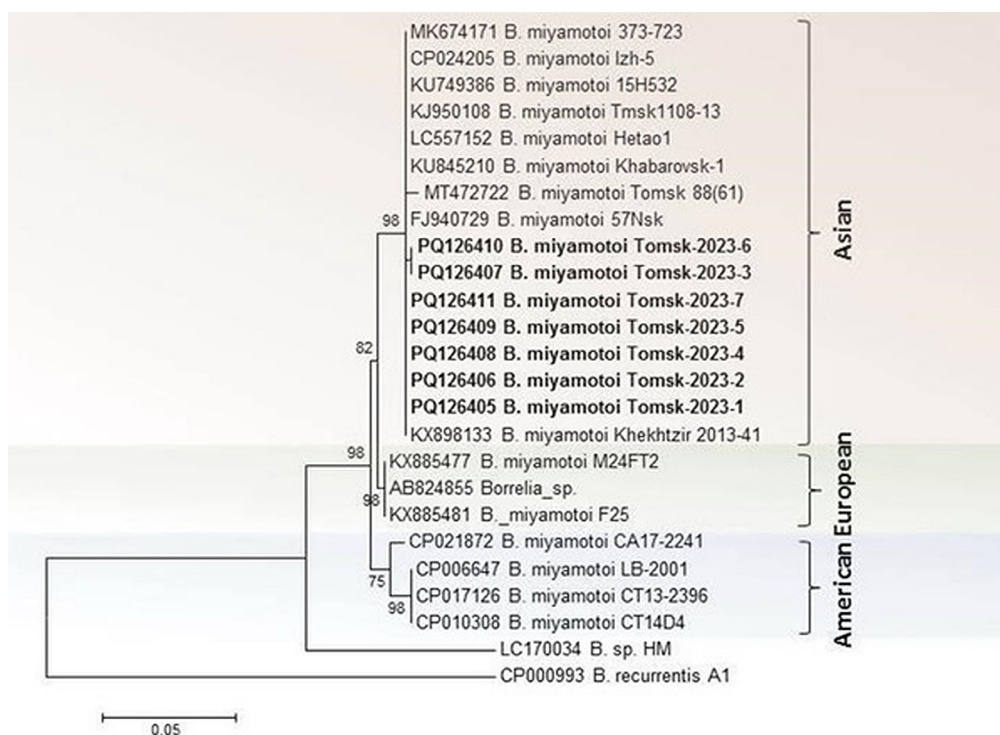


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное по фрагменту гена *glpQ* (433 п.н.) выявленных изолятов *B. miyamotoi*.

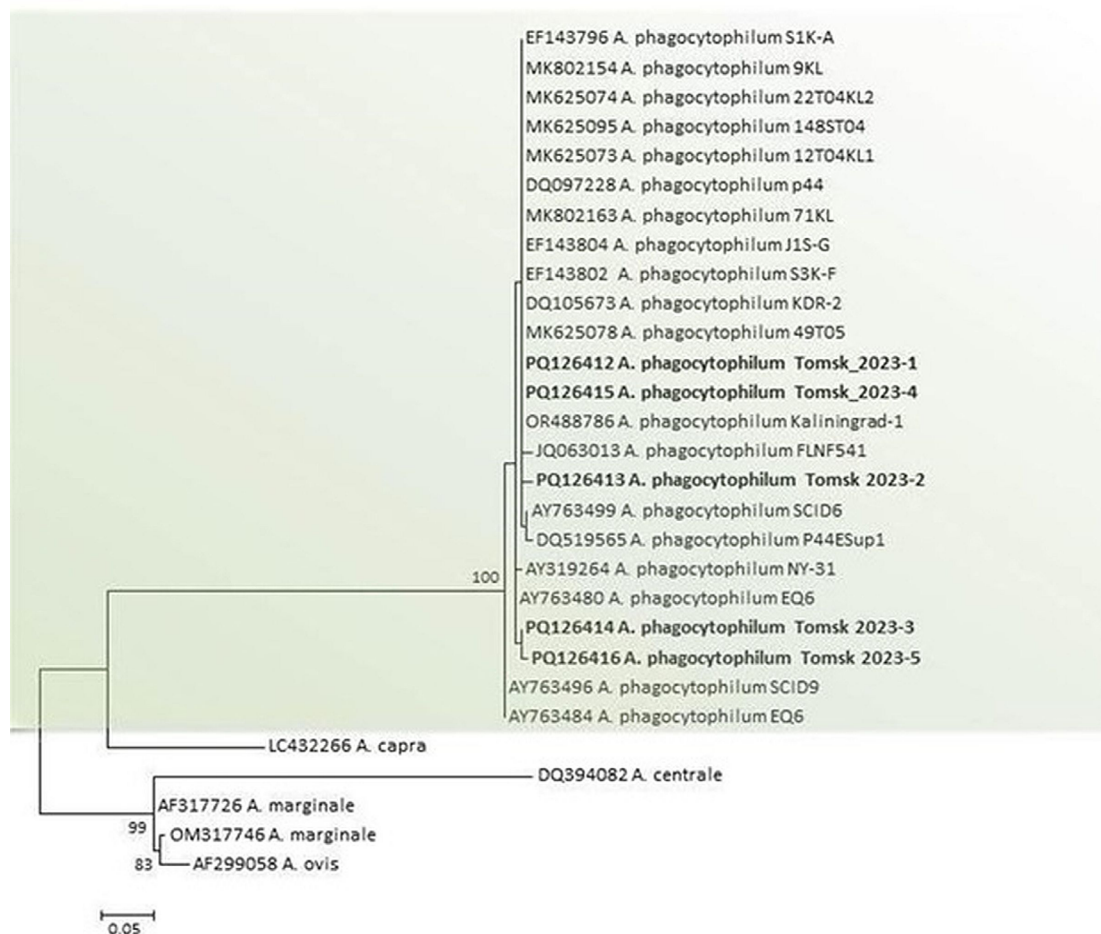


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное по фрагменту гена *msp2* (340 п.н.) выявленных изолятов *A. phagocytophilum*.

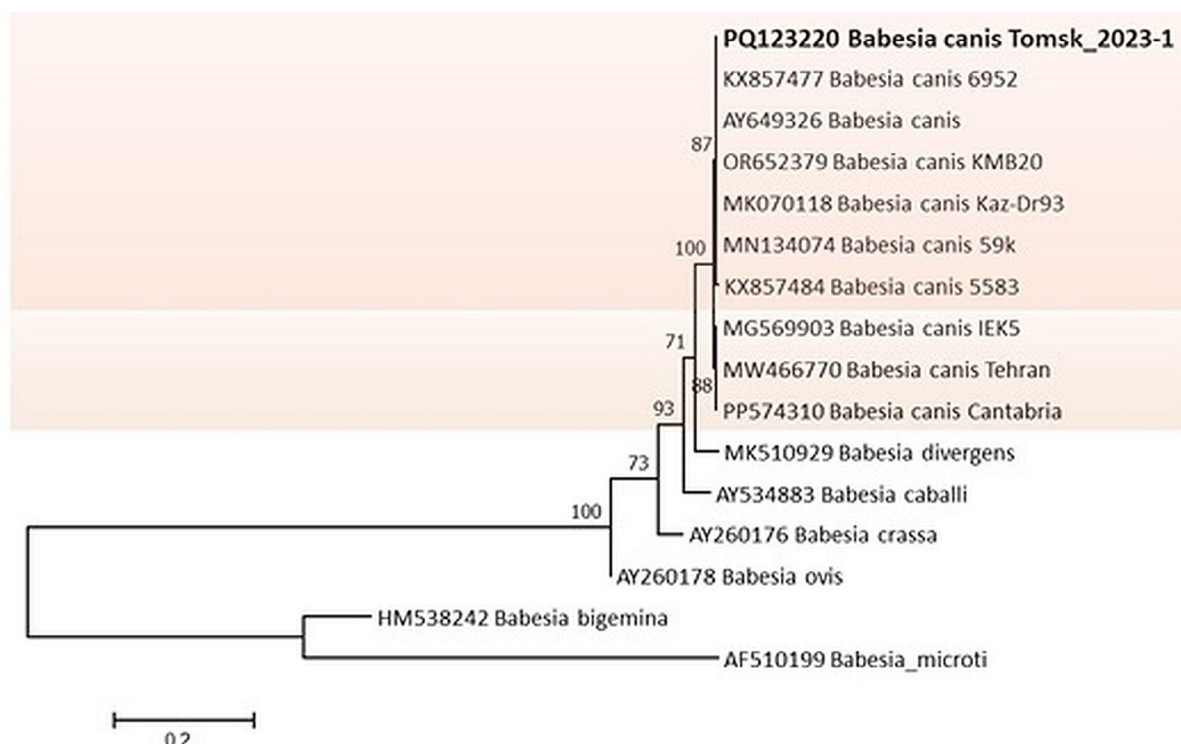


Рис. 6. Филогенетическое дерево, построенное по фрагменту гена 18S рибосомальной РНК (394 п.н.) выявленного изолята *B. canis*.

группу в пределах своего вида с изолятами, ранее обнаруженными в Польше, Калининграде и Северной Америке.

Наиболее часто в ПЦР выявлялся генетический материал риккетсий (табл. 2). Так, ДНК *R. tarasevichiae* была выявлена в 48 (14,1%) из 341 клеща рода *Ixodes*, ДНК *R. raoultii* — в 94 (48,7%) особях из 193 клещей рода *Dermacentor*, в 5 клещах рода *Ixodes* — 1,5%. В 1 клеще *D. reticulatus* была обнаружена ДНК *B. canis* по фрагменту гена 18S рРНК (0,5% случаев), его филогенетическое дерево представлено на **рис. 6**. Генетический материал вируса Кемерово в исследованных клещах не выявлен.

В ряде случаев было обнаружено несколько клещевых патогенов в 1 клеще. Так, в 8 (2,3%) клещах рода *Ixodes* выявлена ДНК 2 клещевых патогенов. Генетический материал *B. garinii* и *R. tarasevichiae* был обнаружен в 5 клещах, *B. garinii* и *B. miyamotoi* — в 2 клещах, *B. garinii* и *A. phagocytophilum* — в 1. Более того, в 1 клеще рода *Ixodes* обнаружена ДНК сразу 3 клещевых патогенов (*B. garinii*, *R. tarasevichiae* и *A. phagocytophilum*).

Обсуждение

Среди изученных нами иксодовых клещей доминировали виды *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus* (79,9%), что в последнее время характерно для Томска и Новосибирска и их пригородов [6–8]. Так, увеличение численности *D. reticulatus* более чем в 200 раз в городских биотопах Томска было впервые

зарегистрировано осенью 2015 г. При определении видового состава клещей, нападающих на человека в Новосибирске и его пригородах, зарегистрировано также, что клещи *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus* составляют 84,8% среди клещей, снятых с пациентов, обратившихся за оказанием медицинской помощи по поводу укуса клеща в 2018 г. Доминирование клещей *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus* в 2023 г. в биотопах Томска и его пригородов свидетельствует об устойчивом характере этого явления и фактическом вытеснении таёжного клеща из биотопов этих мегаполисов на юге Западной Сибири. При этом независимое исследование в 2019 г. природного биотопа на реке Томь, расположенного выше Томска по течению (приблизительно 125 км), выявило практическое полное доминирование таёжного клеща, представленность которого составила 95,72% при сборах с растительности, а доли клеща *I. pavlovskyi* и его гибридов составили всего 1,75 и 2,53% соответственно при сравнимом объёме выборки [19]. Такая драматическая разница видового состава клещей в городских и природных биотопах в бассейне одной реки на юге Западной Сибири позволяет предположить, что антропогенное воздействие существенно меняет условия размножения клещей и спектр ассоциированных с ними клещевых инфекций в местах компактного проживания человека.

В результате проведённых исследований в иксодовых клещах трех видов был обнаружен генетический материал 9 видов клещевых патогенов

вирусной, бактериальной и протозойной природы. ВКЭ был обнаружен в 4 клещах (таёжный клещ), а все выявленные изоляты ВКЭ были отнесены к сибирскому генотипу. Как известно, на территории северной Евразии ВКЭ в основном представлен тремя основными генотипами — дальневосточным, сибирским и европейским, первый из которых наиболее часто вызывает тяжёлые клинические формы клещевого энцефалита, а второй чаще встречается на территории Западной Сибири [5]. Выявленные нами изоляты сибирского генотипа ВКЭ можно отнести к субкладе V, для которой типовым вирусом принято считать штамм Заусаев. Первоначально штамм Заусаев был выделен в Москве из мозга погибшего пациента с хронической формой клещевого энцефалита (в течение 2 лет), который предположительно заразился в Томской области и заболел через 10 лет после присасывания клеща в 1973 г. [20].

Однако в Томске и его пригородах ранее была выявлена циркуляция вариантов ВКЭ сибирского субтипа в 2006–2008 гг., относящихся к субкладе IV, штаммы Kolarovo-2008 (FJ968751) и Tomsk-PT122 (KM019545), а также вариантов дальневосточного генотипа [7, 9, 21]. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей показал, что изоляты ВКЭ 2023 г. являются новыми для Томска, причём необычный изолят Tomsk 2023-2 формирует отдельную филогенетическую ветвь, которая может быть перспективной на выделение в отдельный субклайд внутри сибирского генотипа ВКЭ. Нам не удалось обнаружить генетический материал вируса Кемерово в исследованных клещах, хотя имеются сообщения о его обнаружении в Западной Сибири и Казахстане [12].

Инфицированность клещей рода *Ixodes* *B. burgdorferi* комплекса s.l. составила 8,5%, что ниже средних значений последних лет [1–2, 6, 22–23]. Наиболее часто выявлялись *B. garinii* (65,5% случаев), реже определялись *B. afzelii* (24,1%) и *B. bavariensis* (10,4%). Популяция боррелий — возбудителей ИКБ гетерогенна, насчитывает более 20 видов боррелий, а на видовое разнообразие боррелий существенное влияние оказывает разнообразие резервуарных хозяев, которые обеспечивают циркуляцию и сохранение возбудителей ИКБ. С мелкими мышевидными грызунами обычно ассоциируются *B. afzelii* и *B. bavariensis*, с птицами — *B. garinii* [23]. Вполне вероятно, что доминирование *B. garinii* можно связать с тем, что в городских условиях важным прокормителем иксодовых клещей могут быть птицы [1, 8, 13, 24]. В иксодовых клещах рода *Dermacentor* ДНК *B. burgdorferi* s.l. нам не удалось обнаружить, но возможность наличия боррелий в клещах *D. reticulatus* подтверждается рядом публикаций [23, 24]. Филогенетический анализ секвенированных фрагментов ДНК боррелий показал, что изоляты боррелий формировали компактные монофилетические группы

в пределах своего вида. Причём изоляты *B. garinii* группировались в 3 различные филогенетических ветви. При этом одна из этих групп, включающая в себя 9 изолятов, не ассоциировалась с изолятами, ранее найденными в Томске. Вероятно, можно говорить о появлении новых генетических вариантов *B. garinii* в городских биотопах Томска. В равной степени это предположение распространяется на изоляты *B. afzelii* и *B. bavariensis*, которые также формируют новые филогенетические группы.

ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена в 2,1% исследованных клещей рода *Ixodes*. Данный вид боррелий относится к возбудителям клещевых возвратных лихорадок, которые широко распространены в различных регионах мира, включая Россию [25–28]. С данным видом боррелий ассоциируются беззрительные формы ИКБ, при этом возбудитель способен вызывать тяжёлые формы заболевания, включая менингоэнцефалит, у людей с ослабленным иммунитетом, и микст-инфекции с другими возбудителями клещевых патогенов. Инфицированность иксодовых клещей *B. miyamotoi* обычно значительно ниже, чем боррелиями других видов и колеблется в пределах от 0,3–16% [27, 28]. В 2023 г. в иксодовых клещах рода *Dermacentor* нам не удалось выявить ДНК *B. miyamotoi*, хотя в 2021 г. в Томской области она обнаруживалась в 2% клещей *D. reticulatus* [3]. Филогенетический анализ 7 изолятов *B. miyamotoi* по фрагменту гена *glpQ* показал, что все они формируют достаточно компактную геногруппу в пределах азиатского субтипа и кластеризуются вместе с ранее обнаруженными вариантами на территории Томской, Новосибирской областей, Хабаровского и Красноярского краёв.

Наиболее высокая инфицированность изученных клещей была установлена для риккетсий (48,7% для *R. raoultii* и 14,1% для *R. tarasevichiae*), при этом *R. tarasevichiae* встречались только в клещах рода *Ixodes*, а *R. raoultii* — в клещах рода *Dermacentor*. Данные риккетсии способны вызывать у человека клещевые риккетсиозы, их циркуляция установлена в разных регионах РФ, преимущественно в Сибири, и Казахстане [29–30]. В Томской области ежегодно регистрируются лишь единичные случаи риккетсиоза [2, 4]. Как известно, *R. raoultii* встречается во многих странах Европы, в разных областях России, таких как Новосибирская, Омская, Иркутская, в Республиках Алтай и Бурятия, в Приморском и Хабаровском краях и обычно ассоциируется с клещами рода *Dermacentor* [6–7, 10, 30]. В настоящее время принято считать, что *R. raoultii* способен вызывать развитие синдрома TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy), который характеризуется первичным аффектом в виде эритемы, развивающимся в месте присасывания клеща, и болезненностью регионарных лимфоузлов [31–33]. Выявление генетического материала *R. raoultii* у луговых клещей, для

которых зарегистрирован взрывной рост численности (более чем 200 раз) в городских биотопах, требует обратить особое внимание на диагностику синдрома TIBOLA у пациентов в Томской области. Для *R. tarasevichiae* характерно инфицирование клещей рода *Ixodes* (чаще *I. persulcatus*, реже *I. pavlovskyi*). Данный вид риккетсий распространён на территории азиатской части России, а случаи инфицирования человека *R. tarasevichiae* были зафиксированы в Новосибирской области [6].

Генетические маркеры *A. phagocytophilum* выявлены в 1,5% особей клещей рода *Ixodes* и не были обнаружены в клещах рода *Dermacentor*, хотя ранее генетический материал *A. phagocytophilum* выявлялся в клещах *D. reticulatus* на территории Томска [7]. Все секвенированные изоляты *A. phagocytophilum* формируют монофилетическую группу в пределах своего вида с изолятами, ранее обнаруженными в Польше, Калининграде и Северной Америке, что, по всей вероятности, демонстрирует консерватизм гена *msp2*, использованного для генотипирования. Также в Томской области ранее регистрировалась инфицированность иксодовых клещей бабезиями [2]. В результате проведённого исследования нам удалось обнаружить *B. canis* только в 1 клеще рода *Dermacentor*.

Микст-инфекции, ассоциированные с различными клещевыми инфекциями, встречаются достаточно часто и могут влиять на течение и клинические проявления заболеваний [34]. Мы выявляли разные сочетания возбудителей клещевых инфекций в иксодовых клещах, при этом во всех случаях микст-инфицирования встречалась *B. garinii*.

Сравнивая уровень инфицированности различных видов клещей, мы выявили достоверно значимый более высокий уровень инфицированности боррелиями (ОШ = 3,1; 95% ДИ 1,43–6,72; $F = 0,004$; $\chi^2 = 8,9$), риккетсиями (ОШ = 18,81; 95% ДИ 7,25–48,82; $F = 0,000$; $\chi^2 = 60,17$) и анаплазмами (ОШ = 8,75; 95% ДИ 0,97–79,2; $F = 0,038$; $\chi^2 = 5,35$) клещей *I. persulcatus* по сравнению с *I. pavlovskyi*. При этом в доминирующих в городских биотопах клещах *I. pavlovskyi* регистрировался более широкий спектр патогенов (ВКЭ, *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, *R. tarasevichiae* и *A. phagocytophilum*). Клещи рода *Dermacentor* были преимущественно инфицированы *R. raoultii*, а остальные возбудители клещевых инфекций встречались в них значительно реже.

Полученные данные подтверждают необходимость мониторинга циркуляции в природных и антропоургических очагах клещевых инфекций Томска и Томской области наряду с ВКЭ и возбудителями других клещевых инфекций: *B. miyamotoi*, *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. Необходимо дальнейшее совершенствование методов диагностики и профилактики данных инфекций, включая выявление возможных случаев заболевания

человека и микст-инфекции. Важно подчеркнуть, что в настоящее время 3 вида клещей (*I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *D. reticulatus*), инфицированных не менее чем 9 видами клещевых патогенов, доминируют в городских биотопах и принимают участие в формировании городских очагов клещевых инфекций в парковой зоне Томска.

Заключение

На территории Томска и пригородов среди иксодовых клещей, собранных с растительности, преобладают *I. pavlovskyi* и *D. reticulatus*. В результате ПЦР-анализа в иксодовых клещах 3 видов были обнаружены 9 видов клещевых патогенов вирусной, бактериальной и протозойной природы, которые, по-видимому, принимают участие в формировании городских очагов клещевых инфекций. Более высокие уровни инфицированности боррелиями, риккетсиями и анаплазмами выявлены у клещей *I. persulcatus* по сравнению с *I. pavlovskyi*. В клещах *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* регистрировали более широкий спектр патогенов (ВКЭ, *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, *R. tarasevichiae* и *A. phagocytophilum*), чем в клещах вида *D. reticulatus* (ВКЭ, *R. raoultii* и *B. canis*).

Инфицированность таёжных клещей ВКЭ составила 1,3%. Инфицированность клещей рода *Ixodes*: *B. burgdorferi* s.l. — 8,5%, *B. miyamotoi* — 2,1%, *A. phagocytophilum* — 1,5%, *R. tarasevichiae* — 14,1%. Кроме того, показатель встречаемости *R. raoultii* в клещах *D. reticulatus* составил 48,7%, а в единичном образце была обнаружена ДНК *B. canis*. На основе секвенирования выделенных фрагментов генов ВКЭ, *B. burgdorferi* s.l., *B. miyamotoi*, *A. phagocytophilum* и *B. canis* проведено генотипирование возбудителей клещевых инфекций. Все выявленные изоляты ВКЭ при анализе полноразмерной нуклеотидной последовательности генома отнесены к сибирскому генотипу, субклайду V. Последовательности депонированы в GenBank.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Полторацкая Н.В., Полторацкая Т.Н., Панкина Т.М., и др. Анализ эпидемиологической ситуации по клещевому энцефалиту и иксодовому клещевому боррелиозу в Томской области. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2021;(1):9–15. Poltoratskaya N.V., Poltoratskaya T.N., Pankina T.M., et al. Analysis of the epidemiological situation on tick-borne encephalitis and ixodid tick-borne borreliosis in Tomsk region. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* 2021;(1):9–15.
DOI: <https://doi.org/10.33092/0025-8326mp2021.1.9-15>
EDN: <https://elibrary.ru/mfwclw>
- Воронкова О.В., Романенко В.Н., Симакова А.В. и др. Анализ множественной инфицированности иксодовых клещей *Dermacentor reticulatus* в сочетании природном очаге трансмиссивных инфекций в Томской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(2):106–11. Voronkova O.V., Romanenko V.N., Simakova A.V., et al. Analy-

- sis of multiple infection in ixodic ticks *Dermacentor reticulatus* in a combined natural focus of vector-borne infections in the Tomsk region. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(2):106–11.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-2-106-111>
EDN: <https://elibrary.ru/xluwjc>
3. Воронкова О.В., Лукашова Л.В., Карпова М.Р. и др. Циркуляция возбудителя возвратной клещевой лихорадки *Borrelia miyamotoi* в природном очаге Томской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2022;27(1):15–22.
Voronkova O.V., Lukashova L.V., Karpova M.R., et al. Distribution of the causative agent of relapsing tick-borne fever *Borrelia miyamotoi* in natural focus in the Tomsk region. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2022;27(1):15–22.
DOI: <https://doi.org/10.17816/EID109070>
EDN: <https://elibrary.ru/hxuspn>
 4. Полторацкая Н.В., Полторацкая Т.Н., Панкина Т.М. и др. Характеристика природных очагов клещевого энцефалита на территории Томской области. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2021;(3):3–11. Poltoratskaya N.V., Poltoratskaya T.N., Pankina T.M., et al. Characteristics of natural tick-borne encephalitis foci in the Tomsk region. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* 2021;(3):3–11.
DOI: <https://doi.org/10.33092/0025-8326mp2021.3.3-11>
EDN: <https://elibrary.ru/jcdonv>
 5. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res*. 2003;57(1-2):129–46.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00206-1)
 6. Карташов М.Ю., Кривошеина Е.И., Свиринов К.А. и др. Генотипирование возбудителей клещевых инфекций и определение видового состава клещей, нападающих на людей в Новосибирске и его пригородах. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(6):1103–12. Kartashov M.Yu., Krivosheina E.I., Svirin K.A., et al. Genotyping of tick-borne pathogens and determination of human attacking tick species in Novosibirsk and its suburbs. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(6):1103–12.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GOT-1979>
EDN: <https://elibrary.ru/zwdbcf>
 7. Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Кривошеина Е.И. и др. Генотипирование возбудителей клещевых инфекций в клещах *Dermacentor reticulatus*, собранных в городских биотопах г. Томска. *Паразитология*. 2019;53(5):355–69. Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Krivosheina E.I., et al. Genotyping of tick-borne pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in urban biotopes of Tomsk. *Parazitologiya*. 2019;53(5):355–69.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0031184719050016>
EDN: <https://elibrary.ru/xodhop>
 8. Романенко В.Н., Соколенко В.В., Максимова Ю.В. Локальное формирование высокой численности клещей *Dermacentor reticulatus* (Parasitiformes, Ixodidae) в Томске. *Паразитология*. 2017;51(4):345–53. Romanenko V.N., Sokolov V.V., Maksimova Yu.V. Local formation of high abundance of *Dermacentor reticulatus* (Parasitiformes, Ixodidae) ticks in Tomsk. *Parazitologiya*. 2017;51(4):345–53.
EDN: <https://elibrary.ru/zgoydh>
 9. Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y.V., et al. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia). *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5(2):145–51.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.10.004>
 10. Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Кривошеина Е.И. и др. Генотипирование возбудителей клещевого энцефалита и лихорадки Кемеро-во в таежных клещах, собранных в Республике Коми. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(1):159–66. Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Krivosheina E.I., et al., Genotyping of tick-borne encephalitis and Kemerovo viruses in taiga ticks collected in the Komi Republic. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(1):159–66.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GOT-1147>
EDN: <https://elibrary.ru/ycyhgg>
 11. Del Cerro A., Oleaga A., Somoano A., et al. Molecular identification of tick-borne pathogens (*Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Coxiella burnetii* and piroplasms) in questing and feeding hard ticks from North-Western Spain. *Ticks Tick Borne Dis*. 2022;13(4):101961.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101961>
 12. Kholodilov I.S., Belova O.A., Ivannikova A.Y., et al. Distribution and characterisation of tick-borne Flavi-, Flavi-like, and Phenuiviruses in the Chelyabinsk region of Russia. *Viruses*. 2022;14(12):2699. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14122699>
 13. Tkachev S.E., Tikunov A.Y., Babkin I.V., et al. Occurrence and genetic variability of Kemerovo virus in *Ixodes* ticks from different regions of Western Siberia, Russia and Kazakhstan. *Infect. Genet. Evol*. 2017;47:56–63.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.007>
 14. Rar V., Livanova N., Tkachev S., et al. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasit. Vectors*. 2017;10(1):258. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2186-5>
 15. Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Терновой В.А. и др. Высокоэффективная детекция ДНК риккетсий методом ПЦР в реальном времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015;60(12):39–43. Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Ternovoi V.A., et al. The highly effective detection of DNA rickettsia using technique of polymerase chain reaction in real-time. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2015;60(12):39–43.
EDN: <https://elibrary.ru/vhthvt>
 16. Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1997;47(2):252–61. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207113-47-2-252>
 17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–7.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
 18. Kumar S., Stecher G., Li M., Nkay C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol*. 2018;35(6):1547–9.
DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 19. Boldbaatar B., Cleary N.G., Paoli J.E., et al. Characterization of tick-borne encephalitis virus isolates from *Ixodes persulcatus* ticks collected during 2020 in Selenge, Mongolia. *Pathogens*. 2024;13(12):1086.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens13121086>
 20. Kovalev S., Okulovskaya V. The first record of Omsk hemorrhagic fever virus and tick-borne encephalitis virus of Baltic lineage from the Kemerovo region of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2024;24(7):443–50.
DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2023.0156>
 21. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., et al. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol*. 2003;77(1):25–36.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.25-36.2003>
 22. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В. и др. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2009;43(5):374–88. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., et al. Genetic diversity of ixodid tick-borne pathogens in Tomsk city and suburbs. *Parazitologiya*. 2009;43(5):374–88. EDN: <https://elibrary.ru/oihzdth>
 23. Воронкова О.В., Ильинских Е.Н., Рудиков А.А. и др. Клинико-эпидемиологические проявления очагов иксодового клещевого боррелиоза в Томской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(4):70–9. Voronkova O.V., Ilyinskikh E.N., Rudikov A.A., et al. Clinical and epidemiological manifestations of Ixodic tick-borne borreliosis

- foci in the Tomsk region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(4):70–9.
DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-70-79>
EDN: <https://elibrary.ru/jkbkbzw>
24. Рудакова С.А., Теслова О.Е., Муталинова Н.Е. и др. Молекулярно генетический надзор на основе индикации и идентификации боррелий в иксодовых клещах. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2023;8(1):63–70.
Rudakova S.A., Teslova O.T., Mutalinova N.E., et al. Molecular genetic surveillance based on the identification of *Borrelia* in ixodid ticks. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2023;8(1):63–70.
DOI: <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-1-63-70>
EDN: <https://elibrary.ru/nzddjy>
25. Zajac V., Wojcik-Fatla A., Sawczyn A., et al. Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med*. 2017;24(1):26–32.
DOI: <https://doi.org/10.5604/12321966.1233893>
26. Kim C.M., Seo J.W., Kim D.M., et al. Detection of *Borrelia miyamotoi* in Ixodes nipponensis in Korea. *PLoS One*. 2019;14(7):e0220465.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220465>
27. Cleveland D.W., Anderson C.C., Brissette C.A. *Borrelia miyamotoi*: a comprehensive review. *Pathogens* 2023;12(2):267.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12020267>
28. Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., et al. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* – a human health risk? *Euro Surveill*. 2019;24(18):1800170.
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.18.1800170>
29. Тупота Н.Л., Терновой В.А., Карташов М.Ю. и др. Детекция *Borrelia miyamotoi* в иксодовых клещах, собранных на юге Западной Сибири. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(3):129–33. Tupota N.L., Ternovoy V.A., Kartashov M.Yu., et al. Detection of *Borrelia miyamotoi* in Ixodidae ticks collected in the South of Western Siberia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(3):129–133.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-3-129-133>
EDN: <https://elibrary.ru/jkhmuuj>
30. Яковчиц Н.В., Бондаренко Е.И., Адельшин Р.В. и др. Выявление ДНК возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах на территории Иркутской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;14(6):43–6. Yakovchits N., Bondarenko E., Adelshin R., et al. Detection of rickettsial DNA in ticks in Irkutsk region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;14(6):43–6.
DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-6-43-46>
EDN: <https://elibrary.ru/vbiajp>
31. Igolkina Y., Krasnova E., Rar V., et al. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* DNA in clinical samples. *Clin. Microbiol. Infect*. 2018;24(2):199.e9–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.003>
32. Świtaj K., Chmielewski T., Borkowski P., et al. Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii* — case report. *Przegl. Epidemiol.* 2012;66(2):347–50.
33. Silva-Pinto A., Santos M. de L., Sarmiento A. Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5(6):656–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.016>
34. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in ixodid ticks in the Far East of Russia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl*. 2019;8:192–202.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.01.005>

Информация об авторах

Ильинских Екатерина Николаевна — д-р мед. наук, доцент, профессор каф. инфекционных болезней и эпидемиологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, Россия, infconf2009@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7646-6905>

Карпова Мария Ростиславовна[✉] — д-р мед. наук, профессор, зав. каф. микробиологии и вирусологии, Сибирского государственного медицинского университета, Томск, Россия, karpova.mr@ssmu.ru, mrkarpova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7109-9955>

Воронкова Ольга Владимировна — д-р мед. наук, доцент, зав. каф. биологии и генетики Сибирского государственного медицинского университета, Томск, Россия, voronkova-ov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9478-3429>

Решетова Алина Васильевна — аспирант каф. инфекционных болезней и эпидемиологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, Россия, wind_of_change95@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5195-3897>

Филатова Евгения Николаевна — аспирант каф. инфекционных болезней и эпидемиологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, Россия, synamber@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9951-8632>

Карташов Михаил Юрьевич — канд. биол. наук, с. н. с. отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, kartashov_myu@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Кривошеина Екатерина Ильинична — н. с. отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, krivosheina_ei@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Беличенко Ксения Руслановна — стажер-исследователь отдела разработки и производства диагностических наборов для вирусных инфекций ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, belichenko_kr@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0003-2330-025X>

Information about the authors

Ekaterina N. Ilyinskikh — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of infectious diseases and epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia, infconf2009@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7646-6905>

Maria R. Karpova[✉] — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of microbiology and virology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia, karpova.mr@ssmu.ru, mrkarpova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7109-9955>

Olga V. Voronkova — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of biology and genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia, voronkova-ov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9478-3429>

Alina V. Reshetova — postgraduate student, Department of infectious diseases and epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia, wind_of_change95@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5195-3897>

Evgenia N. Filatova — postgraduate student, Department of infectious diseases and epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia, synamber@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9951-8632>

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

Ekaterina I. Krivosheina — researcher, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, krivosheina_ei@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>

Ksenia R. Belichenko — research assistant, Department of development and production of diagnostic tools for viral diseases, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, belichenko_kr@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0003-2330-025X>

Терновой Владимир Александрович — канд. биол. наук, в. н. с., зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, tern@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Локтев Валерий Борисович — д-р биол. наук, профессор, зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ГНЦ «Вектор», Кольцово, Россия, valeryloktev@gmail.com; loktev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Участие авторов: *Карташов М.Ю.* — методология и дизайн исследования, геномные исследования, биоинформационный анализ, написание рукописи; *Ильинских Е.Н., Карпова М.Р.* — организация сбора и формирование коллекции иксодовых клещей, их идентификация и анализ первичных полевых данных, написание рукописи; *Воронкова О.В., Решетова А.В., Филатова Е.Н.* — формирование коллекции иксодовых клещей, их идентификация и анализ первичных полевых данных; *Кривошеина Е.И., Беличенко К.Р., Терновой В.А.* — геномные исследования, биоинформационный и статистический анализ, написание рукописи; *Локтев В.Б.* — концептуализация исследования, написание и редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям 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 16.03.2025;
принята к публикации 25.05.2025;
опубликована 28.06.2025

Vladimir A. Ternovoi — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, tern@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Valery B. Loktev — Dr. Sci (Biol.), Professor, chief researcher, Head, Department of molecular virology for flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, valeryloktev@gmail.com; loktev@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Authors' contribution: *Kartashov M.Yu.* — methodology and design of the research, genomic studies, bioinformatic analysis, writing the manuscript; *Ilyinskikh E.N., Karpova M.R.* — management and collection of *Ixodes* ticks, their identification, analyses of fields data, writing the manuscript; *Voronkova O.V., Reshetova A.V., Filatova E.N.* — collection of *Ixodes* ticks, their identification, analyses of fields data; *Krivosheina E.I., Belichenko K.R., Ternovoi V.A.* — genomic studies, bioinformatics and statistical analysis, visualization, manuscript writing; *Loktev V.B.* — conceptualization of the study, writing and editing the manuscript. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the 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 16.03.2025;
accepted for publication 25.05.2025;
published 28.06.2025



Сочетанное действие гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11* при формировании резистентности *Candida albicans* к триазоловым противогрибковым препаратам

Несвижский Ю.В.^{1,2✉}, Афанасьев С.С.², Зверев В.В.¹, Воропаев А.Д.², Афанасьев М.С.¹, Воропаева Е.А.², Буданова Е.В.¹, Смирнова Л.М.¹, Анисова С.А.¹, Урбан Ю.Н.²

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

²Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Современная медицина сталкивается с резистентностью *Candida* spp. к антимикотикам, обусловленной изменением экспрессии и структуры гена *ERG11* — молекулярной мишени триазолов. Эти механизмы часто действуют одновременно, однако взаимодействие между ними остаётся недостаточно изученным.

Цель работы — изучение роли гиперэкспрессии гена *ERG11* и его мутаций в формировании резистентности грибов *C. albicans* к триазолам.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 11 штаммах грибов *C. albicans* из коллекции МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Штаммы были охарактеризованы по уровню экспрессии гена *ERG11* и наличию в нем мутаций, а также чувствительности к триазолам: позаконазолу, вориконазолу, итраконазолу и флуконазолу.

Результаты. Штаммы *C. albicans* подразделили на 4 группы: 1-я группа — только с повышенной экспрессией гена *ERG11*; 2-я — только с мутациями в данном гене; 3-я — одновременно оба вида генетических изменений; 4-я — без данных генетических изменений. Установлено, что минимальная подавляющая концентрация (МПК) триазолов в 1-й группе была в 15,76 раза выше, чем во 2-й, в 4,97 раза выше, чем в 3-й, и в 2,51 раза ниже, чем в 4-й (везде $p < 0,05$). Во 2-й группе МПК триазолов была в 3,17 раза ниже, чем в 3-й, и в 40 раз ниже ($p < 0,001$), чем в 4-й. МПК триазолов в 3-й группе по сравнению с 4-й группой была в 12,5 раза ниже ($p < 0,001$). Популяционное варьирование МПК триазолов в большей степени зависит от изолированного действия мутаций гена *ERG11* (45,94%), что в 5,27 раза превосходит эффект изолированной гиперэкспрессии гена.

Заключение. Устойчивость *C. albicans* к триазолам обеспечивается кооперативным действием гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11*: наибольшую резистентность обеспечивает гиперэкспрессия, популяционное разнообразие — мутации.

Ключевые слова: *Candida albicans*, антимикотики, резистентность, ген *ERG11*, гиперэкспрессия, мутации

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: Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Зверев В.В., Воропаев А.Д., Афанасьев М.С., Воропаева Е.А., Буданова Е.В., Смирнова Л.М., Анисова С.А., Урбан Ю.Н. Сочетанное действие гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11* при формировании резистентности *Candida albicans* к триазоловым противогрибковым препаратам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):325–330.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-653>

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

The combined action of *ERG11* gene overexpression and its mutations in the development of *Candida albicans* resistance to triazolic antifungals

Yuri V. Nesvizhsky^{1,2✉}, Stanislav S. Afanasiev², Vitaly V. Zverev¹,
Alexander D. Voropaev², Maxim S. Afanasiev¹, Elena A. Voropaeva²,
Elena V. Budanova¹, Ludmila M. Smirnova¹, Sofia A. Anisova¹, Yulia N. Urban²

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

²G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Modern medicine is faced with the resistance of *Candida* spp. to antimycotics, due to changes in the expression and structure of the *ERG11* gene, the molecular target of triazoles. These mechanisms often operate simultaneously, but the interaction between them remains poorly understood.

The aim of this study is to investigate the interaction between *ERG11* gene overexpression and mutation in the development of triazole resistance in *C. albicans*.

Materials and methods. Eleven *C. albicans* strains from the G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology culture collection were analyzed. Each strain was characterized by its *ERG11* gene expression level, the presence of *ERG11* mutations, and its susceptibility to the triazoles posaconazole, voriconazole, itraconazole and fluconazole.

Results. The *C. albicans* strains (n – number of tested strains) were categorized into four groups: Group 1 ($n = 2$, *ERG11* overexpression only), Group 2 ($n = 3$, *ERG11* mutations only), Group 3 ($n = 4$, both *ERG11* overexpression and mutation) and Group 4 ($n = 2$, neither *ERG11* overexpression nor mutation). The minimum inhibitory concentration (MIC) of Triazoles in Group 1 was 15.76-fold higher than in Group 2, 4.97-fold higher than in Group 3, and 2.51-fold lower than in Group 4 ($p < 0.05$ for all comparisons). The MIC of triazoles in Group 2 was 3.17-fold lower than in Group 3 and 40.00-fold lower than in Group 4 ($p < 0.001$). The MIC of triazoles in Group 3 was 12.5-fold lower than in Group 4 ($p < 0.001$). Population-level variation in triazoles MIC was more strongly influenced by the isolated effect of *ERG11* mutations (45.94%) than by the isolated effect of *ERG11* overexpression (5.27-fold less).

Conclusion. Triazole resistance in *C. albicans* is influenced by the combined actions of *ERG11* overexpression and mutation. *ERG11* overexpression appears to contribute more to the absolute level of resistance, while *ERG11* mutations have a greater impact on the diversity of resistance levels within the *C. albicans* population.

Keywords: *Candida albicans*, antimycotics, resistance, *ERG11* gene, overexpression, mutations

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: Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Zverev V.V., Voropaev A.D., Afanasiev M.S., Voropaeva E.A., Budanova E.V., Smirnova L.M., Anisova S.A., Urban Yu.N. The combined action of *ERG11* gene overexpression and its mutations in the development of *Candida albicans* resistance to triazolic antifungals *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):325–330.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-653>

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

Введение

Современная медицина давно столкнулась с проблемой резистентности микробов к химиотерапевтическим препаратам. К настоящему моменту этот вопрос достаточно хорошо изучен и известно множество различных механизмов, обеспечивающих микробам уход от токсического действия антибиотиков. Наиболее примечательными являются генетически детерминированные механизмы резистентности, связанные со значительным увеличе-

нием продукции молекулярных мишеней антибиотиков или изменением структуры этих молекул-мишеней. Обсуждаемые механизмы резистентности могут реализовываться в микробной клетке параллельно и даже независимо друг от друга. Вместе с тем результаты их кооперативного действия недостаточно ясны [1–3].

Данный вопрос мы исследовали на примере грибов рода *Candida*, которых проблема резистентности к противомикробным антибиотическим

препаратам также не обошла стороной. Одним из таких механизмов у данных микробов является повышенная экспрессия генов, кодирующих синтез мишени лекарственного препарата. В этом плане немаловажную роль играет ген *ERG11*, определяющий структуру ланостерол-14 α -деметилазы. Она участвует в синтезе эргостерола, важного компонента клеточной стенки гриба. Гиперэкспрессия гена *ERG11* обеспечивает синтез большого количества эргостерола, что в итоге делает грибы рода *Candida* малочувствительными к терапевтическим дозам препаратов азолового ряда [4].

Между тем в последнее время в гене *ERG11* был обнаружен ряд несинонимичных мутаций, способных модифицировать эффекты данного гена в сторону как снижения, так и повышения чувствительности грибов рода *Candida* к азолам [5–9]. Например, согласно полученным нами данным, мутации в гене *ERG11* снижали эффекты его гиперэкспрессии и уменьшали минимальную подавляющую концентрацию (МПК) триазоловых препаратов в мутантных штаммах *C. albicans* до 100 раз [10]. При этом полной отмены исходной резистентности не наблюдалось. Примечательно, что гиперэкспрессия гена *ERG11* и его мутации проявляются в различных штаммах *Candida* spp. относительно независимо [5, 7–9, 11–15].

Очевидно, что оба отмеченных вида генетической изменчивости участвуют в формировании популяционного разнообразия грибов рода *Candida* по степени чувствительности к азолам. Однако остаются неясными характер и результат взаимодействия этих механизмов. Представляется, что исследование данного вопроса может составить чёткое представление о стратегии выживания *Candida* spp. в условиях массивированного медикаментозного воздействия и перспективных векторах управления эпидемией микробной резистентности.

Цель настоящего исследования — изучение взаимодействия гиперэкспрессии гена *ERG11* и его отдельных мутаций в формировании резистентности грибов *C. albicans* к триазоловым противогрибковым препаратам (ТПП).

Материалы и методы

Исследование выполнено на 11 штаммах грибов *C. albicans* из коллекции Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, изначально устойчивых к действию флуконазола и вориконазола.

Коллекционные штаммы грибов *C. albicans* прошли видовую идентификацию по биохимической активности и мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), а также по уровню экспрессии и наличию мутаций гена *ERG11*. Подробное описание технологии характеристики дано в работе [10].

Согласно имеющейся характеристике, 7 исследованных штаммов были носителями 5 вариантов несинонимичных мутаций в гене *ERG11* (*E266D*, *G464S*, *I471L*, *D116E* и *V488I*). В 6 штаммах была выявлена повышенная экспрессия гена *ERG11*.

Все исследованные штаммы *C. albicans* были разделены на 4 группы в соответствии с обнаруженными генетическими изменениями: 1-я группа (2 штамма) — только с повышенной экспрессией гена *ERG11*; 2-я (3 штамма) — с мутациями только в данном гене; 3-я (4 штамма) — с одновременной экспрессией обоих видов генетических изменений; 4-я (2 штамма) — без указанных генетических изменений.

Чувствительность изучаемых штаммов грибов *C. albicans* к четырем представителям ТПП (позаконазол, вориконазол, итраконазол, флуконазол) исследовали в соответствии с рекомендациями Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, основанных на стандартах CLSI M44 и M60 для грибов и стандартах и критериях Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST) для метода микроразведений и бактериальных культур¹.

МПК препарата (в мг/мл) определяли методом серийных микроразведений с помощью планшетов «Sensititre YeastOne10» («Trek diagnostic system»). Для этого инокулят подготавливали аналогично диско-диффузионному методу, после чего вносили в модифицированную среду RPMI-1640 и распределяли по 96-луночным планшетам для серийных микроразведений с предварительно внесёнными субстанциями ТПП [11]. Учёт результатов производили визуально, по сравнению с ростом в лунке с положительным контролем в соответствии с критериями EUCAST [12].

Для обеспечения сопоставимости результатов исследования данные по отдельным штаммам *C. albicans* к каждому ТПП были взвешены по среднему значению МПК для данного препарата. В дальнейшем анализировали полученные относительные значения.

Для статистического анализа использовали программное обеспечение «Microsoft Excel», «SciPy», «Matplotlib». Оценку значимости различий между проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Вклад факторов в популяционную изменчивость признака оценивали в одно- и двухфакторном анализе с повторами (ANOVA). Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимали за $p < 0,05$.

¹ Рекомендации МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)». URL: <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations>

Таблица 1. МПК ТПП при различных вариантах генетических изменений в гене *ERG11* *C. albicans* ($X \pm m$)

Группа штаммов Strain group	<i>n</i>	Позаконазол	Вориконазол	Итраконазол	Флуконазол
1	2	1,361 ± 1,351	1,184 ± 1,045	1,363 ± 1,353	1,579 ± 1,483
2	3	0,008 ± 0,002	0,139 ± 0,000	0,008 ± 0,002	0,191 ± 0,000
3	4	0,028 ± 0,019	0,383 ± 0,244	0,026 ± 0,020	0,669 ± 0,317
4	2	4,068 ± 1,357	3,343 ± 1,115	4,075 ± 1,359	2,296 ± 0,765

Результаты

МПК ТПП при различных генетических изменениях в *C. albicans* представлены в **табл. 1**. Оказалось, что различия между отдельными препаратами для каждого варианта генетических изменений отсутствуют и имеют единую направленность. Данный факт позволил нам объединить результаты исследования МПК в единую группу триазолов. Итоговые характеристики групп представлены в **табл. 2**.

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что МПК триазолов в 1-й группе была в 15,76 раза выше ($p < 0,05$), чем во 2-й, в 4,97 раза выше ($p < 0,05$), чем в 3-й, и в 2,51 раза ниже ($p < 0,05$), чем в 4-й. Во 2-й группе МПК триазолов была в 3,17 раза ниже, чем в 3-й, и в 40 раз ниже ($p < 0,001$), чем в 4-й. МПК триазолов в 3-й группе была в 12,5 раза ниже ($p < 0,001$) по сравнению с 4-й.

Оценку влияния различных генетических изменений на степень варьирования МПК триазолов

в исследованной популяции *C. albicans* проводили с использованием дисперсионного анализа. Однофакторная модель показала, что совокупный эффект повышенной экспрессии и мутаций гена *ERG11* составляет 58,58% ($p < 0,001$).

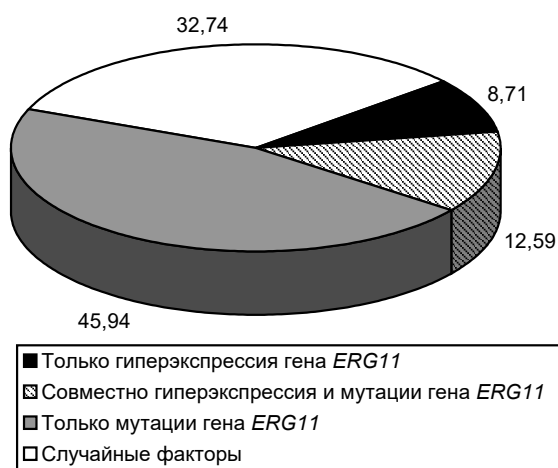
Для расчёта соотносительного влияния данных генетических изменений применили двухфакторный дисперсионный анализ (**рисунок**). На долю изолированного действия мутаций гена *ERG11* пришлось почти половина (45,94%) всех эффектов генетических факторов, что более чем в 5,27 раза превышает вклад изолированного действия повышенной экспрессии этого гена и в 3,65 раза — сочетанного действия мутаций и гиперэкспрессии. При этом на долю совокупного эффекта всех генетических изменений приходится 67,26%, что сопоставимо с результатами расчёта однофакторной модели.

Обсуждение

Мы подтвердили, что резистентность штаммов *C. albicans*, изначально устойчивых к действию флуконазола и вориконазола, к препаратам триазолового ряда обеспечивается как гиперэкспрессией гена *ERG11*, так и его мутациями. При этом был установлен принцип взаимодействия рассмотренных генетических механизмов в формировании резистентности: оба фактора могут действовать как независимо, так и в кооперации. Гиперэкспрессия гена *ERG11* обладает более выраженным действием, чем его мутации, что совпадает с данными других авторов [4–9, 16, 17].

При сочетанном действии должна происходить суммация эффектов гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11*. Мутации способны нивелировать эффекты повышенной экспрессией гена *ERG11*. Конечный результат их сочетанного действия в нашем случае проявляется заметным снижением влияния последней. Мы не берёмся экстраполировать отмеченное на все возможные варианты генетически детерминированной резистентности изучаемого микроба и поэтому склонны расценивать данный факт как особенность нашей коллекции штаммов *C. albicans*.

К такой же особенности стоит отнести высокую резистентность к ТПП штаммов *C. albicans*, не экспрессирующих изменения в гене *ERG11*. Помимо них, например, может возникать гиперэкспрессия в генах *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и др. [4, 5], сравнительную эффективность которых ещё предстоит оценить.



Двухфакторная модель влияния генетических изменений в гене *ERG11* на варьирование МПК триазолов в популяции *C. albicans*, %.

Таблица 2. МПК ТПП в исследуемых группах

Группа штаммов Strain group	<i>n</i>	$X \pm m$	Me [Q_1 ; Q_3]
1	8	1,371 ± 0,501	1,184 [0,010; 2,470]
2	12	0,087 ± 0,024	0,075 [0,007; 0,139]
3	16	0,276 ± 0,113	0,112 [0,006; 0,152]
4	8	3,445 ± 0,522	2,889 [1,879; 3,759]

При проведении дисперсионного анализа мы приняли в расчёт, что популяционное разнообразие грибов *C. albicans* по чувствительности к ТПП определяется одновременно обоими векторами изменений в гене *ERG11*. Между тем долевое участие данных векторов оказалось неравнозначным. Установлена доминирующая роль мутаций гена *ERG11* в этом процессе.

Оценивая биологическое и медицинское значение гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11* в грибах *C. albicans*, мы обратили внимание на то, что гиперэкспрессия гена *ERG11* и связанная с ней гиперпродукция молекулы ланостерол-14 α -деметилазы намного эффективнее защищает *C. albicans* от пагубного воздействия ТПП, чем синтез генетически изменённых вариантов молекулы. Однако точечные несинонимичные мутации в этом гене явно способствуют повышению биологического разнообразия данного дрожжеподобного гриба, не усугубляя в значительной мере его медицинскую опасность в краткосрочной перспективе. Поэтому с практической точки зрения с целью прогнозирования риска возникновения резистентности штаммов *C. albicans* к ТПП представляется целесообразным выявление именно гиперэкспрессии гена *ERG11*.

Заключение

1. Резистентность *C. albicans* к ТПП обеспечивается кооперативным действием гиперэкспрессии гена *ERG11* и его мутаций.

2. Эффект гиперэкспрессии гена *ERG11* существенно превосходит таковой его несинонимичных мутаций.

3. Мутации гена *ERG11* по сравнению с его гиперэкспрессией являются доминантами при формировании популяционного разнообразия *C. albicans* по резистентности к ТПП.

4. Для прогнозирования возникновения резистентности *C. albicans* к ТПП целесообразно тестировать штаммы на гиперэкспрессию гена *ERG11*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Xiong L., Wang X., Wang Y., et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam. *WIREs Mech. Dis.* 2022;14(6):e1571. DOI: <https://doi.org/10.1002/wsbm.1571>
2. Azargun R., Gholizadeh P., Sadeghi V., et al. Molecular mechanisms associated with quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: review and update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2020; 114(10):770–81. DOI: <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa041>
3. Gogry F.A., Siddiqui M.T., Sultan I., Haq Q.M.R. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. *Front. Med. (Lausanne)*. 2021;8:677720. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>
4. Biswas C., Chen S.C., Halliday C., et al. Identification of genetic markers of resistance to echinocandins, azoles and 5-fluorocytosine in *Candida glabrata* by next-generation sequencing: a feasibility study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017;23(9):676.e7–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.014>
5. Cernicka J., Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006;27(5):403–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.12.005>
6. Lim H.J., Shin J.H., Kim M.N., et al. Evaluation of two commercial broth microdilution methods using different interpretive criteria for the detection of molecular mechanisms of acquired azole and echinocandin resistance in four common *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020;64(11):e00740–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00740-20>
7. Lopes W., Vainstein M.H., Schrank A. Revealing colonial characteristics of *Candida tropicalis* by high-resolution scanning electron microscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019;25 (2):188–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.032>
8. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016;62(4):e1–50. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
9. Castanheira M., Deshpande L.M., Messer S.A., et al. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of *Erg11 Y132F* alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55(1):105799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.003>
10. Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Воропаев А.Д. и др. Спектр и функциональные свойства мутаций гена *ERG11* флуконазол-резистентных грибов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2023;100(4):285–92. Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Voropaev A.D., et al. Spectrum and functional properties of *ERG11* gene mutations in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV-infected patients. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2023;100(4):285–92. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-407> EDN: <https://elibrary.ru/pxrovi>
11. Godinho C.P., Sá-Correia I. Physiological genomics of multistress resistance in the yeast cell model and factory: aocus on MDR/MXR transporters. In: Sá-Correia I., eds. *Yeasts in Biotechnology and Human Health. Progress in Molecular and Subcellular Biology, Volume 58.* Cham;2019:1–35. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-13035-0_1
12. Xu Y., Chen L., Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;61(4):798–804. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn015>
13. Kakeya H., Miyazaki Y., Miyazaki H., et al. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(11):2985–90. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.44.11.2985-2990.2000>
14. Finkina E.I., Bogdanov I.V., Ignatova A.A., et al. Antifungal activity, structural stability, and immunomodulatory effects on human immune cells of defensin from the lentil *Lens culinaris*. *Membranes (Basel)*. 2022;12(9):855. DOI: <https://doi.org/10.3390/membranes12090855>
15. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.* 2021;121(6):3390–411. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
16. Katsipoulaki M., Stappers M.H.T., Malavia-Jones D., et al. *Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2024;88(2):e0002123. DOI: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00021-23>
17. Mahdizade A.H., Hoseinnejad A., Ghazanfari M., et al. The *TAC1* gene in *Candida albicans*: structure, function, and role in azole resistance: a mini-review. *Microb. Drug Resist.* 2024;30(7): 288–96. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2023.0334>

Информация об авторах

Несвижский Юрий Владимирович — д-р мед. наук, профессор, профессор каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия; г. н. с. лаб. клинической микробиологии и биотехнологии МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, nesviz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Афанасьев Станислав Степанович — д-р мед. наук, профессор, г. н. с. лаб. клинической микробиологии и биотехнологии МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, afanasievss409.4@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Зверев Виталий Васильевич — д-р биол. наук, профессор, акад. РАН, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, vitalyzverev@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Воропаев Александр Дмитриевич — канд. мед. наук, м. н. с. лаб. клинической микробиологии и биотехнологии МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, advoropaev@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

Афанасьев Максим Станиславович — д-р мед. наук, проф. каф. клинической аллергологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, maxim.afanasyev78@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>

Воропаева Елена Александровна — д-р мед. наук, проф., г. н. с. лаб. клинической микробиологии и биотехнологии МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, voropaeva2011@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

Буданова Елена Вячеславовна — канд. мед. наук, доцент, доцент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, e.v.budanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1864-5635>

Смирнова Людмила Михайловна — канд. мед. наук, доцент, доцент каф. кожных и венерических болезней ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, lm-smirnova1306@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6581-4529>

Анисова Софья Александровна — студент Клинического института детского здоровья им. Н.Ф. Филатова ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, sofaanisova@ya.ru, <https://orcid.org/0009-0002-1099-4451>

Урбан Юлия Николаевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. клинической микробиологии и биотехнологии МНИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия, urbanek@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0189-3608>

Участие авторов: Несвижский Ю.В. — идея и разработка концепции статьи, построение вероятностных моделей, подготовка окончательной версии статьи для публикации; Афанасьев С.С., Афанасьев М.С. — идея и разработка концепции статьи, построение вероятностных моделей, редактирование и рецензирование статьи; Зверев В.В. — идея и разработка концепции статьи, общее руководство проектом, окончательное утверждение версии статьи для публикации; Воропаев А.Д., Воропаева Е.А. — подготовка и проведение микробиологических исследований, статистический анализ; Буданова Е.В., Смирнова Л.М. — анализ данных мировой литературы, работа с базами данных, подготовка текста статьи; Анисова С.А. — работа с базами данных, подготовка таблиц и рисунков; Урбан Ю.Н. — подготовка и проведение микробиологических исследований, статистический анализ. 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 17.03.2025;
принята к публикации 27.05.2025;
опубликована 28.06.2025

Information about the authors

Yuri V. Nesvizhsky — Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia; chief researcher, Laboratory of clinical microbiology and biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, nesviz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Stanislav S. Afanasiev — Dr. Sci. (Med.), Professor, chief researcher, Laboratory of clinical microbiology and biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, afanasievss409.4@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Vitaly V. Zverev — Dr. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), vitalyzverev@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Alexander D. Voropaev — Cand. Sci. (Med.), junior researcher, Laboratory of clinical microbiology and biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, advoropaev@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

Maxim S. Afanasiev — Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of clinical allergology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, maxim.afanasyev78@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>

Elena A. Voropaeva — Dr. Sci. (Biol.), Prof., chief researcher, Laboratory of clinical microbiology and biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, voropaeva2011@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

Elena V. Budanova — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, e.v.budanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1864-5635>

Ludmila M. Smirnova — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of skin and venereal diseases I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, lm-smirnova1306@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6581-4529>

Sofia A. Anisova — student, Filatov Clinical Institute of Child Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, sofaanisova@ya.ru, <https://orcid.org/0009-0002-1099-4451>

Yulia N. Urban — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory for clinical microbiology and biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, urbanek@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0189-3608>

Authors' contribution: Nesvizhsky Yu. V. — idea and development of the concept of the article, construction of probabilistic models, preparation of the final version of the article for publication; Afanasiev S.S., Afanasiev M.S. — idea and development of the concept of the article, construction of probabilistic models, editing and reviewing the article; Zverev V.V. — idea and development of the concept of the article, final approval of the version of the article for publication; Voropaev A.D., Voropaeva E.A. — preparation and conduct of microbiological studies, statistical analysis; Budanova E.V., Smirnova L.M. — analysis of data of world literature, work with databases, preparation of the text of the article; Anisova S.A. — work with databases, preparation of tables and figures; Urban Yu.N. — preparation and conduct of microbiological studies, statistical 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 17.03.2025;
accepted for publication 27.05.2025;
published 28.06.2025



Global Forecasting Models for Dengue Outbreaks in Endemic Regions: A Systematic Review

Agung Sutriyawan^{1,2✉}, Mursid Rahardjo¹, Martini Martini¹, Dwi Sutiningsih¹,
Cheerawit Rattanapan³, Nur Faeza Abu Kassim⁴

¹Diponegoro University, Semarang, Indonesia;

²Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia;

³Mahidol University, Bangkok, Thailand;

⁴Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

Abstract

Background. Dengue is a rapidly spreading mosquito-borne disease, posing significant global health challenges, particularly in endemic regions. Recent years have witnessed an increase in the frequency and intensity of dengue outbreaks, necessitating robust forecasting models for early intervention.

This systematic review **aims** to synthesize recent literature on dengue forecasting models, evaluate their predictive performance, and identify the most effective approaches.

Materials and methods. A comprehensive search in Scopus, PubMed, ScienceDirect, and Springer databases was conducted following PRISMA guidelines. Studies were selected based on strict inclusion and exclusion criteria, and the quality of the research was evaluated using TRIPOD criteria. Out of 1,366 identified studies, 13 met the eligibility criteria. Data were extracted and analyzed to assess the accuracy and validity of the forecasting models employed.

Results. The findings indicate that machine learning-based models, particularly random forest, outperform conventional statistical models such as ARIMA and Poisson regression. Additionally, climate data — especially temperature and rainfall play a critical role in forecasting dengue incidence.

Conclusion. The present study corroborates the superior efficacy of machine learning-based forecasting models, particularly random forest, in forecasting dengue cases compared to conventional statistical methods. This finding provides a foundation for the development of an enhanced early warning system to address future outbreaks of dengue.

Keywords: dengue, forecast model, machine learning, random forest, early warning system

Funding source. This research was funded by Beasiswa Pendidikan Indonesia (BPI) [202414100900]. The funders had no role in the research design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of this study.

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

For citation: Sutriyawan A., Rahardjo M., Martini M., Sutiningsih D., Rattanapan C., Kassim N.F.A. Global forecasting models for dengue outbreaks in endemic regions: a systematic review. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):331–342.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-694>

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

Модели глобального прогнозирования вспышек денге в эндемичных регионах: систематический обзор

Agung Sutriyawan^{1,2✉}, Mursid Rahardjo¹, Martini Martini¹, Dwi Sutiningsih¹,
Cheerawit Rattanapan³, Nur Faeza Abu Kassim⁴

¹Diponegoro University, Semarang, Indonesia;

²Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia;

³Mahidol University, Bangkok, Thailand;

⁴Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

Аннотация

Введение. Лихорадка денге — быстро распространяющееся заболевание, переносимое комарами, представляет серьёзную проблему для глобального здравоохранения, особенно в эндемичных регионах. Частота и интенсивность вспышек лихорадки денге увеличиваются, что требует создания надёжных моделей прогнозирования для раннего вмешательства.

Цель систематического обзора — обобщить данные литературы о моделях прогнозирования лихорадки денге, оценить их прогностическую эффективность и выявить наиболее эффективные подходы.

Материалы и методы. Всесторонний поиск в базах данных Scopus, PubMed, ScienceDirect и Springer проведён в соответствии с рекомендациями PRISMA. Исследования отбирали на основе строгих критериев включения и исключения, а качество исследований оценивали с помощью критериев TRIPOD. Из 1366 выявленных исследований 13 соответствовали критериям отбора. Данные были проанализированы для оценки точности и обоснованности использованных моделей прогнозирования.

Результаты. Результаты показывают, что модели на основе машинного обучения, в частности «случайный лес», превосходят традиционные статистические модели, такие как ARIMA и регрессия Пуассона. Кроме того, климатические данные, особенно температура и количество осадков, играют важную роль в прогнозировании заболеваемости лихорадкой денге.

Заключение. Настоящее исследование подтверждает более высокую эффективность моделей прогнозирования на основе машинного обучения, в частности «случайный лес», в прогнозировании случаев заболевания лихорадкой денге по сравнению с традиционными статистическими методами. Этот вывод закладывает основу для разработки усовершенствованной системы раннего оповещения для борьбы с будущими вспышками лихорадки денге.

Ключевые слова: денге, модель прогнозирования, машинное обучение, метод случайного леса, система раннего оповещения

Источник финансирования. Это исследование было профинансировано Министерством образования Индонезии (BPI) [202414100900]. Финансирующие организации не принимали участия в разработке дизайна исследования, сборе данных, их анализе, интерпретации или написании этой статьи.

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

Для цитирования: Sutriyawan A., Rahardjo M., Martini M., Sutiningsih D., Rattanapan C., Kassim N.F.A. Модели глобального прогнозирования вспышек денге в эндемичных регионах: систематический обзор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):331–342.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-694>

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

Introduction

Dengue is one of the fastest spreading mosquito-borne disease, especially in tropical and subtropical regions, caused by various types of dengue viruses [1, 2]. The World Health Organization has reported an 8-fold increase in global dengue incidence between 2000 and 2019. In 2023, over 5 million cases were documented across 80 countries, with at least 23 nations experiencing dengue outbreaks. That number has more than doubled in 2024, with more than 10.6 million cases reported in North and South America alone. However, the actual number of cases is likely significantly higher, emphasizing the urgent need for effective public health interventions to mitigate this escalating crisis [3]. Although most infections are harmless, dengue shock syndrome and dengue are severe forms of infection that can lead to death [4, 5]. In the absence of a specific drug or vaccine for this virus, case fatality rates can reach 20% if diagnosis is not prompt [6], particularly in resource-constrained areas. When outbreaks occur on a large scale, the sheer number of severe dengue cases can overwhelm the health system and impede the delivery of optimal care. Dengue also poses a huge social and economic burden to many tropical countries where the disease is endemic [7]. Precise prediction of

outbreak size and trends in disease incidence early can limit further spread [8], and help better plan health resource allocation to meet needs during an outbreak.

The two principal vectors are *Aedes aegypti* and *A. albopictus*, which are capable of transmitting dengue. The transmission of dengue is influenced by a number of factors, including environmental and climate change, urbanization, globalization, vector activity, and behavioral change [9]. The interaction between humans, climate, and mosquitoes gives rise to a complex system that exerts a profound influence on dengue transmission patterns, which in turn affects the likelihood of outbreaks [10]. This relationship has been researched for decades through the development of forecasting models in different parts of the world. These models vary widely, both in terms of purpose [11, 12], and setting [13–15]. While many of these models demonstrate excellence in various tasks, to create efficient prediction models, a systematic, adaptive and generalizable framework is needed, capable of identifying weather- and population-related patterns of vulnerability across geographic regions. The scientific community has not yet reached agreement on which models provide the best predictions. There are many research reports on prediction tools for dengue outbreaks [16–19]. However, research

that provides a comprehensive summary of the performance and predictive ability of these tools remains limited. Previous studies have underscored the value of integrating diverse epidemiological tools, including mapping and mathematical models, to develop an effective early warning system [20]. However, this study did not prioritize the identification of significant predictors in the development of an early warning system for dengue. Other studies that emphasize early warning systems and incorporate numerous case forecasting models have been conducted, but this study solely examines the case experience of the various models utilized [21].

Various forecasting models have been developed over the years, integrating epidemiological, environmental, and climatic variables. While some models rely on traditional statistical methods such as Autoregressive Integrated Moving Average (ARIMA) and Poisson regression [14, 22–24]. Emerging research highlights the superior accuracy of machine learning models, particularly random forest and Long Short Term Memory (LSTM) [25, 26]. However, there is still no consensus on the most effective forecasting approach. To address this research gap, several recent studies have explored novel methodologies in dengue forecasting. Recent studies indicate that integrating deep learning techniques, such as LSTM and transformer models, significantly improves prediction accuracy compared to conventional statistical models [27]. Furthermore, recent findings suggest that incorporating real-time meteorological and mobility data improves forecasting precision [28]. These updated approaches not only improve prediction accuracy but also enhance model adaptability across different geographical regions. Despite these advancements, inconsistencies in data quality, limited external validation, and computational constraints continue to pose challenges in real-world applications. This review focuses on determining which model exhibits the highest accuracy and examining its internal and external validity. Its objective is to synthesize recent literature on dengue case forecasting, discuss related evidence, and evaluate different models' forecasting performance to identify the most effective one.

Materials and methods

This review used the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) approach, which includes methods for determining resources, eligibility, inclusion and exclusion criteria, and the process of systematic review, extraction, and analysis of data from the available literature [7]. PRISMA 2020 replaces the previous edition published in 2009, introducing new reporting guidelines that include more comprehensive study identification, selection, scoring, and synthesis methods [29]. This guide enables the search for terms relevant to the review and provides advice on aspects that need to be addressed in the review report for publication purposes [21].

Research Question Formulation

Research questions were developed using PICO, a useful tool to help frame relevant research questions for systematic reviews. The PICO concept incorporates three important elements (population or problem, importance, and context) [30]. Based on PICO, the three main components in this review are dengue (Problem), case forecast model (Importance), and case prediction (Context). These concepts guided the formulation of the research question: “What is the evidence of the dengue case forecast model and its performance in predicting cases?”

Systematic Searching Strategies

Systematic searching strategies include identification, screening, and eligibility process.

Identification

In the identification stage, synonyms and variations were used to enrich the keywords, then applied in the search process, search strings were created and generated by using Boolean operators and keyword search, as illustrated in **Table 1**. A systematic literature search was conducted against four major databases: Scopus, PubMed, ScienceDirect, and Springer, and identified a total of 1366 relevant records. 16 duplicate records were found and removed, leaving 1,350 records for title screening. All potential records were then exported from the databases and organized into Excel sheets for title and abstract screening.

Screening

Two authors were responsible for the screening of titles and abstracts, which was conducted in accordance with the review questions that had been developed and the specific inclusion and exclusion criteria that had been established. Inclusion criteria were primary research in peer-reviewed journals and English-language articles. We excluded systematic review articles, books, conference proceedings, and non-peer-reviewed articles, such as editorials, commentaries, opinion pieces, or short reports. The screening process resulted in the elimination of 1,120 articles that were deemed irrelevant to the review. The remaining 230 articles were then read in full, including the abstract reading, and assessed for eligibility.

Eligibility

A total of 64 full-text articles were retrieved for eligibility. Two authors independently reviewed all full-text articles for eligibility. All studies found to be unrelated to the interest and outcome of interest were excluded. The reasons for article exclusion were notated. There were 51 articles excluded due to:

- 1) studies that did not focus on predicting the number of future cases ($n = 14$);
- 2) studies that used or evaluated prediction or forecasting models, including machine learning meth-

Table 1. Keywords search used in the screening process

Databases	Keywords used
Pubmed	(((((dengue fever) OR (dengue incidence)) OR (dengue outbreaks)) OR (dengue epidemic)) AND (forecasting models)) OR (predictive models)) OR (prediction models)) OR (epidemic forecasting)) OR (outbreak prediction)) AND (machine learning)) OR (statistical models)) OR (ARIMA)) OR (regression models)) OR (random forest)) OR (neural networks)) OR (support vector machines)) AND (environmental factors)) OR (climate variables)) OR (temperature)) OR (rainfall)) OR (humidity)) OR (climate data)) OR (weather patterns)) AND (endemic regions)) AND (tropical areas)
Scopus	TITLE-ABS-KEY ("dengue fever" OR "dengue incidence" OR "dengue outbreak*" OR "dengue epidemic*") AND ("forecast* model*" OR "predict* model*" OR "prediction model*" OR "epidemic forecast*" OR "outbreak prediction") AND ("machine learning" OR "statistical model*" OR "ARIMA" OR "regression model*" OR "random forest" OR "neural network*" OR "support vector machine*") AND ("environment* factor*" OR "climate variable*" OR "temperature" OR "rainfall" OR "humidity" OR "climate data" OR "weather pattern*") AND ("endemic region*" OR "tropical area*" OR "high-risk area*" OR "disease-endemic region*")
ScienceDirect	Search 1: ("dengue fever" OR "dengue incidence") AND ("forecasting models" OR "prediction models") Search 2: ("dengue fever" OR "dengue incidence") AND ("prediction models" OR "outbreak prediction") AND ("machine learning" OR "statistical models") Search 3: ("dengue fever" OR "dengue outbreaks") AND ("predictive models" OR "forecasting models") AND ("environmental factors" OR "temperature" OR "rainfall")
Springer	("dengue fever" OR "dengue incidence" OR "dengue outbreaks") AND ("forecasting models" OR "predictive models") AND ("machine learning" OR "statistical models" OR "ARIMA") AND ("environmental factors" OR "climate" OR "rainfall") AND ("endemic regions" OR "tropical areas")

ods (random forests, LSTM) or statistical models (such as ARIMA, Seasonal Autoregressive Integrated Moving Average (SARIMA), regression) ($n = 19$);

3) articles that did not involve key climate variables in the forecasting ($n = 11$);

4) studies conducted in non-endemic or low prevalence dengue areas ($n = 7$).

The remaining 13 eligible articles were continued for the quality assessment process.

Quality Assessment

The quality of the study was assessed using the quality assessment criteria described in TRIPOD (Transparent Reporting of multivariable prediction models for Individual Prognosis or Diagnosis) [31]. The TRIPOD statement is a checklist of 22 items, which are considered essential for the proper reporting of research that develops or validates multivariable prediction models [32]. The TRIPOD guidelines explicitly cover the development and validation of prediction models for diagnosis and prognosis across all medical domains and predictor types. Two authors conducted the quality assessment independently. Scores for report levels were obtained by awarding one point for each reported item relevant to the study. The total score was converted to a percentage based on the maximum possible score. Ultimately, 17 articles (with a percentage score $> 70\%$) were included in the review [21]. **Table 2** presents the scores and percentages of each quality assessment adapted from the TRIPOD checklist.

Data Extraction and Synthesis

The author extracted the data independently using a standardized data extraction form and organized it in a Microsoft Excel worksheet. The information collected included: author (year), country, study design,

candidate predictors, research, data frequency, model techniques used, model performance, outcome, model accuracy, evaluation. The PRISMA flowchart is shown in **Figure 1**.

Results

Study characteristics

A total of 13 studies met the eligibility criteria and were included in this systematic review. Of these 13 studies, 4 (31%) were conducted in the Americas, 4 (31%) in East Asia, 4 (31%) in Southeast Asia, and 1 (7%) in South Asia. Brazil was the country with the highest number of eligible studies ($n = 4$) [25, 26, 33, 34], followed by China ($n = 2$) [27, 35], Taiwan ($n = 2$) [36, 37], Vietnam ($n = 2$) [28, 38]. Other studies were conducted in Malaysia [39], Sri Lanka [40], and the Philippines [41]. Five (42%) studies were published between 2015 and 2020, 9 studies between 2018–2022, and 7 (58%) studies were published between 2021–2024. Most studies (46%) used weekly time units, there were 23% studies using monthly data units, and the rest using annual and yearly. More than half ($n = 7$; 54%) of the studies used machine learning model techniques [25–28, 33, 36, 39], and the remaining ($n = 5$; 46%) studies used statistical model techniques [34, 35, 37, 38, 40, 41]. The characteristics of the included studies are summarized in **Fig. 2**. Details of the characteristics within each study are presented in **Table 3**.

Approach and Accuracy of Forecasting Model for dengue cases

Various modeling approaches, such as machine learning and statistical methods for dengue case experience have been used in all included studies. Out of 13 studies, 6 (26,1%) used random forest approach

Table 2. Quality appraisal score of eligible articles adapted from TRIPOD checklist [32, 42]

Daftar periksa	Item	Source													
		[25]	[26]	[27]	[28]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	[38]	[39]	[40]	[41]	
Title and abstract															
Title	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Abstract	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Introduction															
Background and objectives	3a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	3b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Methods															
Source of data	4a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4b	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
Participants	5a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	5b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Outcome	6a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Predictors	7a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Sample size	8	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
Missing data	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Statistical analysis methods	10a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	10b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	10d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Results															
Participants	13a	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	13b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Model development	14a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	14b	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Model specification	15a	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	15b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Model performance	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Discussion															
Limitations	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Interpretation	19b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Implications	20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Other information															
Supplementary information	21	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Funding	22	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	
Final score		27	20	20	20	24	20	21	25	20	20	20	20	20	
Percentage		100	74.1	74.1	74.1	88.9	74.1	77.8	92.6	74.1	74.1	74.1	74.1	74.1	

[25–27, 33, 36, 39], 5 (21,7%) used LSTM approach [26, 28, 34, 38, 41], 3 (13%) used ARIMA [34, 40, 41], 2 others used Least Absolute Shrinkage and Selection Operator (LASSO), Gradient Boosting, XGBoost poisson regression, SARIMA. In terms of performance, all studies use different methods, including Root Mean Squared Error (RMSE), R-Squared (R^2), Pearson Correlation, Mean Absolute Percentage Error (MAPE), RMSE, Mean Absolute Error (MAE), Area Under the Curve (AUC), Mean Squared Error (MSE), Mean

Squared Logarithmic Error (MSLE), Akaike Information Criterion (AIC). The type of model used can be seen in **Fig. 3**.

Of the 13 articles included, there are 3 best forecasting methods with the highest model accuracy, namely random forest, LSTM, and LASSO. 6 articles using the random forest method, showed an average model accuracy of 89% [25–27, 33, 36, 39], from 5 articles using the LSTM method, there are 3 articles that show model accuracy, and the average obtained is 89% [26, 28, 38],

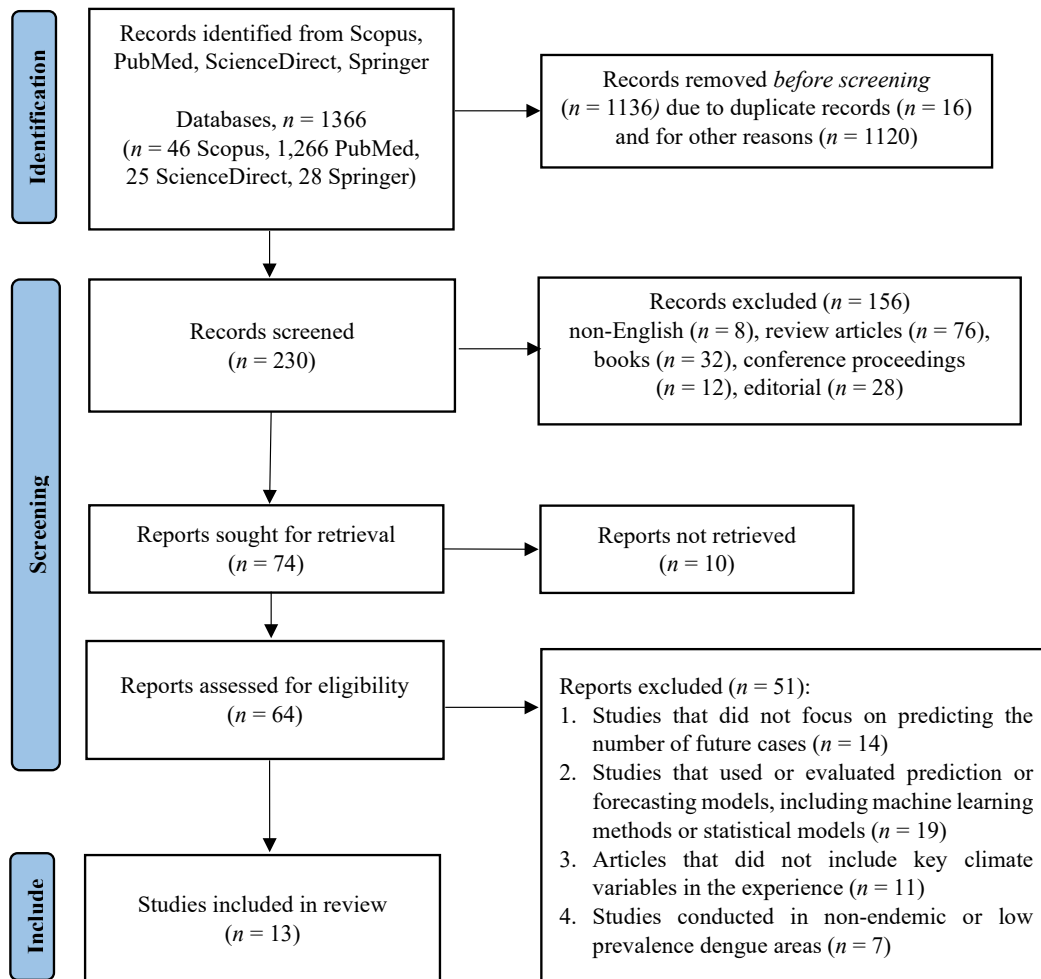


Fig. 1. Systematic review flow.

while the other 2 articles do not mention the percentage of model accuracy [34, 41]. Of the 2 articles that used the LASSO method, the average model accuracy was 65% [26, 33]. The accuracy of the forecasting models can be seen in **Fig. 4**. In general, all of the case experience models included in the study showed fairly good forecasting ability. Overall, climate indicators were the most frequently used in showing the best performance. However, there are studies that used a combination of climate and epidemiological indicators, which showed that previous dengue cases significantly influenced current dengue cases [39].

Random forest model accuracy

The **Figure 5** illustrates the accuracy of various random forest models applied in dengue forecasting studies. The dataset includes models developed by six original research, with accuracy values ranging from 83% to 92%. The average model accuracy is recorded at 89%. The results highlight the superior predictive performance of random forest models in dengue incidence forecasting, reinforcing their potential for integration into early warning systems for outbreak management.

Discussion

This systematic review aims to summarize and discuss the evidence of various dengue case forecasting methods, model performance, and their ability to explain dengue incidence. This review shows that dengue prediction studies have become a topic of research interest, especially in Asia, where 69% of these included studies were conducted in Asia. This trend is due to the fact that the Asian region represents about 70% of the dengue burden globally [43]. Climate data, particularly temperature, rainfall and humidity are important predictors of dengue incidence, but they are often not available in time for health providers working on dengue early warning systems. Several studies have found that countries with better meteorological records provide higher performance metrics [25, 34, 35]. Therefore, integration with local meteorological departments on real-time meteorological data will improve access to meteorological information and benefit end users in early outbreak detection.

In general, climatic variables show an important role in the prediction of dengue cases. Climate variables such as mean temperature [25, 27, 28, 38, 39],

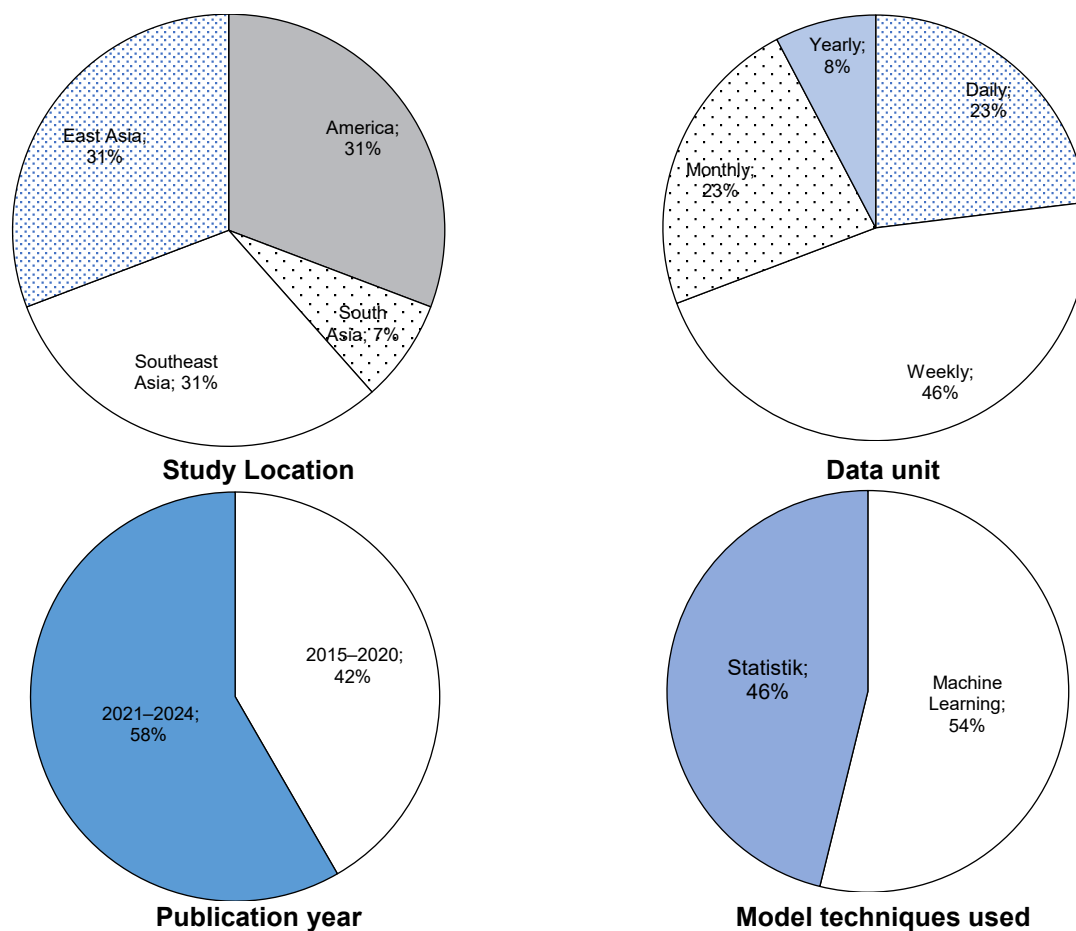


Fig. 2. Study characteristics.

minimum temperature [27, 35–37], maximum temperature [27, 37, 38], rainfall [27, 28, 36, 37, 39], humidity [25, 33, 39, 40], relative humidity [25, 28, 33], wind speed [25, 28, 33], evaporation and sunshine [28] are important input parameters in the development of den-

gue incidence prediction models. Temperature showed the best predictive capacity of the meteorological variables studied in this review. In Vietnam, temperature was a significant predictor in the best dengue forecasting model, where the AUC and sensitivity were 87.42%

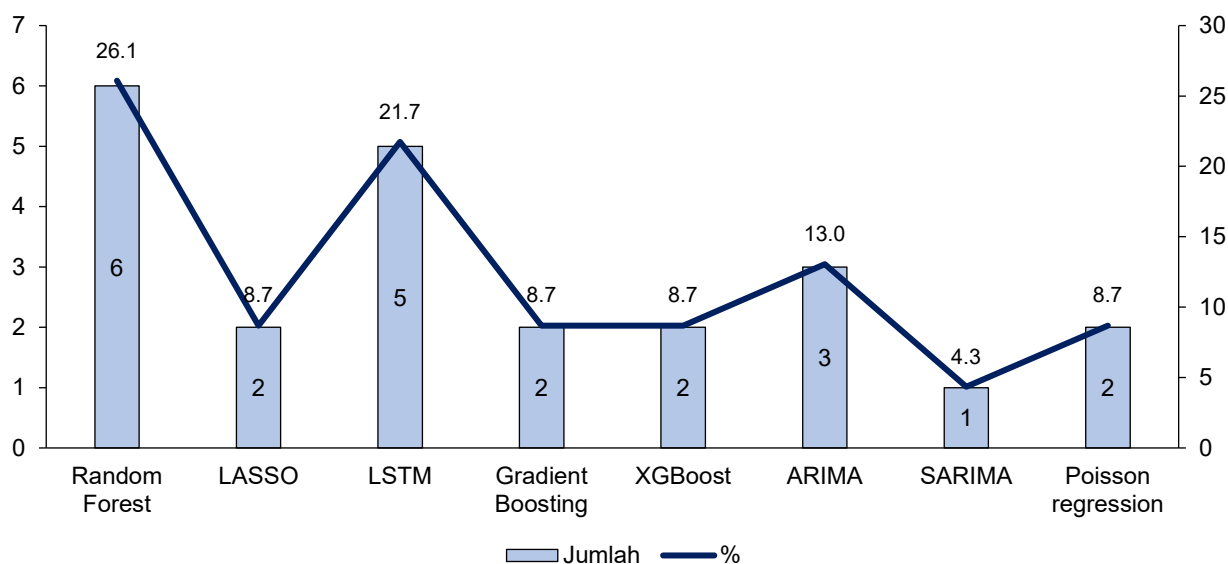


Fig. 3. Type of model technique used.

Table 3. The details for characteristic and main findings of each study

Source	Country	Study Design	Candidate predictors	Data Unit	Model techniques used	Model performance	Outcome	Model Accuracy	Evaluation
[25]	Brazil	Observational Study	Rainfall, maximum temperature, minimum temperature, relative median temperature, insolation, rate of evaporation, median relative humidity, median wind speed	Monthly	Machine Learning (Random Forests, Gradient Boosting, Multilayer Perceptron, Support Vector Regression)	RMSE, MAE (Lowest errors with Random Forests)	Monthly cases of dengue incidence	RMSE: 15.5 = 84.5% MAE: 11.9 = 88.1%	Internal and External
[26]	Brazil	Comparative Study	Historical dengue cases, climate variables, tweets	Weekly	Machine Learning (LSTM, Random Forest, LASSO)	MSE, MSLE	Forecasting dengue incidence	LSTM = MSE = 0.04 (96%), MSLE = 0.01 (100%) Random Forest = MSE = 0.17 (83%), MSLE = 0.13 (87%) LASSO = MSE = 0.4 (60%), MSLE = 0.33 (67%)	Internal and external
[27]	China	Spatiotemporal Analysis	Imported cases, Tmin, Forest, Pop, Prec, Tmean, GDP, RH, Cropland, Tmax, Impervious, Water	Daily	Random Forest, Gradient Boosting Machine, Support Vector Machine	AUC	Dengue incidence	AUC = 0.91 (91%)	Internal and external
[28]	Vietnam	Observational	Climate data (temperature, precipitation, humidity, evaporation, sunshine hours)	Daily	Machine Learning (LSTM, LSTM-ATT, CNN, Transformer)	RMSE and MAE	Forecasting dengue fever incidence	RMSE: 1.60 MAE: 1.95 Accuracy rate 100%	Internal only
[33]	Brazil	Quantitative research design	Epidemiological data, Google search data, Weather	Weekly	Random Forest, LASSO Regression	RMSE, R ² , Pearson Correlation	Dengue incidence	LASSO = 70%-90% Up to 90%	Internal only
[34]	Brazil	Ecological Time-Series Study	Climatic, environmental, social factors	Monthly	Statistical models (ARIMA, ETS, TBATS, BATS, STLM, StructTS, NNETAR, ELM, MLP, null model)	MAPE, Relative MAPE, Theil's U	Dengue cases	ARIMA and TBATS are the best models in various time horizons (12 months, 6 months, dan 3 months) Model accuracy not mentioned	Internal only
[35]	China	Time series analysis	Imported cases, Minimum temperature, Accumulative precipitation	Monthly	Time series Poisson regression	R ²	Dengue outbreaks	R ² = 0.98 (98%)	Internal only
[36]	Taiwan	Observational Study	Meteorological variables, AQI, vector data	Daily	Machine Learning (Random Forest, XGBoost, Logistic Regression)	AUC	Dengue fever incidence	Random Forest: AUC = 0.9547, Accuracy = 89.94% XGBoost: AUC = 0.9329 Logistic Regression: AUC = 0.7905	Internal only
[37]	Taiwan	Observational Study	Minimum temperature, Maximum cumulative rainfall	Yearly	Poisson Regression	MSE	Dengue incidence	MSE for validation set = 2.21 MSE for training set = 2.11	Internal only
[38]	Vietnam	Observational Study	Climate variables (temperature, humidity, precipitation), time-shifted variables	Weekly	SARIMAX XGBoost LSTM Negative Binomial Regression	MAE, RMSE, AIC	Weekly dengue case counts	SARIMAX = 25.678 (83.33%) XGBoost = 21.409 (100%) LSTM = 30.456 (70.34%) Negative Binomial Regression = 22.345 (95.78%)	Internal only
[39]	Malaysia	Time Series Analysis	Epidemiological (notified cases, onset cases, interventions), Environmental (rainfall, temperature, humidity)	Weekly	Random Forest Support Vector Machine (SVM) Artificial Neural Network (ANN) Autoregressive Distributed Lag (ADL) Hierarchical Forecasting (Optimal Combination) Hierarchical Forecasting (Bottom Up)	MAPE	Dengue outbreak forecasting	Random Forest = 95% (with all factors) SVM = 92.47%; ANN = 86.10% ADL = 85.70% Hierarchical Forecasting (Optimal Combination) = 85.67% Hierarchical Forecasting (Bottom Up) = 84.85%	Internal only
[40]	Sri Lanka	Time Series Analysis	Historical dengue incidence data	Weekly	Modified ARIMA (Statistical)	MAPE	Dengue incidence forecast	MAPE: 1.554 (44.6%) (Validation), 0.3184 (Training) (68.16%)	Internal only
[41]	Philippines	Hybrid Model Development	Dengue incidence, climate data, past incidence	Weekly	ARIMA, NNAR, ANN, SVM, LSTM	RMSE, MAE, SMAPE	Dengue outbreaks	Hybrid ARIMA-NNAR: ~85%	Internal only

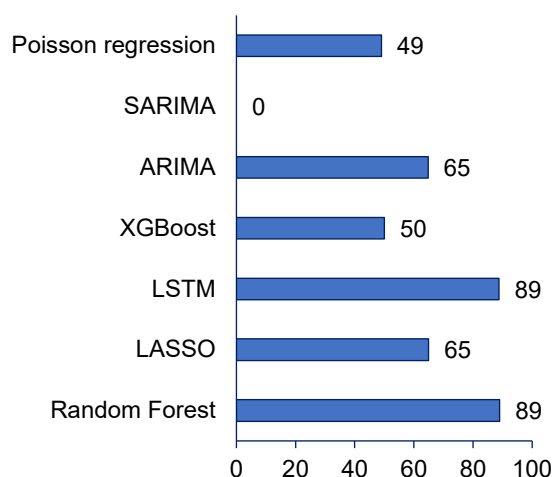


Fig. 4. Average model accuracy.

and 96.88%, respectively [28]. In Ba Ria Vung Tau Province, Vietnam reported temperature and humidity as reliable variables in predicting dengue cases, where the AUC and sensitivity were 90.00% and 85.00%, respectively [38]. Meanwhile, Taiwan showed that temperature and rainfall are important factors in predicting dengue cases, where the AUC and sensitivity are 88% and 80% respectively [37].

In general, the dengue case prediction models included in the studies demonstrated a relatively high level of predictive ability. However, the predictive accuracy of these models varies considerably depending on the specific model employed and the quality of the data used. The most commonly utilized statistical modeling techniques in dengue research are ARIMA, Generalized Additive Models (GAM), Negative Binomial Regression, and Poisson Regression. ARIMA and GAM are established models for examining the relationship between environmental factors and disease outcomes,

as well as for conducting time series prediction analysis [44, 45]. According to recent literature, time series techniques are particularly considered effective in predicting the highly auto-correlated nature of dengue infections [46]. In recent years, data-driven techniques based on machine learning algorithms such as Random Forest, Decision Tree, Support Vector Machine (SVM), and Naïve Bayes have shown promising results in predictive analysis for classification problems [47].

More than half of the included studies rely on machine learning methods, particularly supervised learning models, to assess conventional and novel data streams. Supervised learning models are defined by the use of labeled data sets to train algorithms to accurately classify data or predict outcomes [21]. The advantages of machine learning techniques that demonstrate lower error rates in comparison to conventional statistical-based models in predicting dengue cases are manifold. In the era of big data, this technique can utilize the availability of data and, in addition to being non-parametric, it can also provide leeway in terms of strict assumptions [7]. Random forest, neural network, gradient boosting, and support vector algorithms are part of important machine learning algorithms, which have made significant contributions to several areas of public health, especially in forecasting infectious diseases such as COVID-19 [48], malaria [49], and have similar uses for making dengue outbreak predictions [7].

In some of the studies included in this literature, we assume that the machine learning method using random forest is the best method at the moment. Findings in Brazil state that the accuracy of this model in recognizing dengue cases is more than 90% [33]. Likewise, findings in Malaysia state that the accuracy of this model reaches 95% [39]. Similar findings in another study in Singapore, which stated that the potential of random forest and its strong predictive ability in clustering the

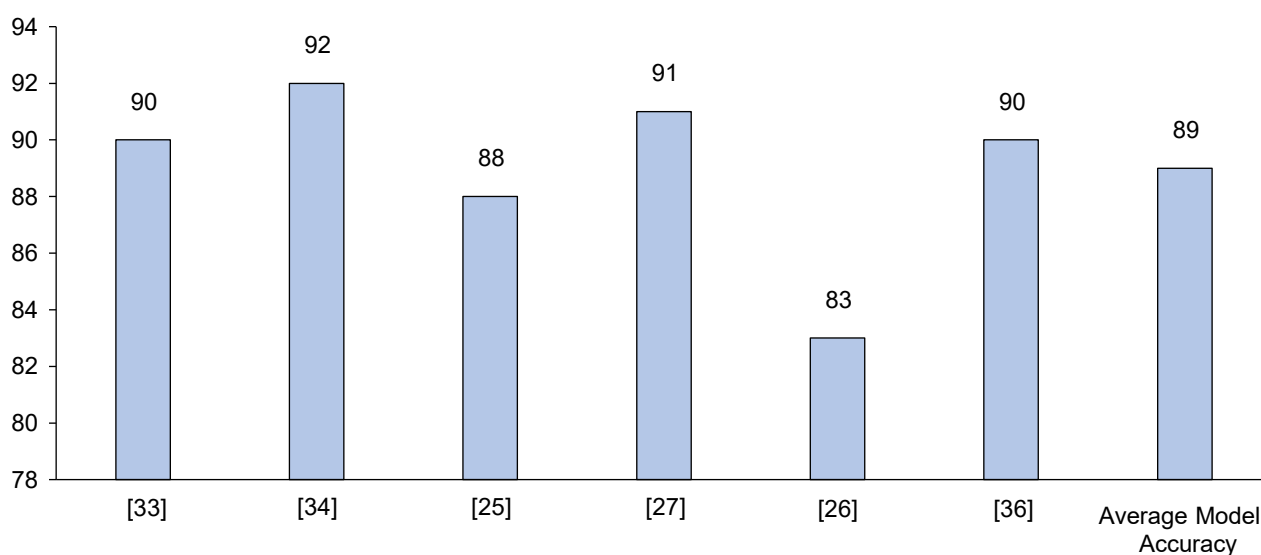


Fig. 5. Random forest model accuracy.

spatial risk of dengue transmission in Singapore. The dengue risk map generated using random forest has high accuracy and is a good tool to guide vector control operations, allowing targeted preventive measures before and during dengue outbreaks [50].

All studies employed internal validation to assess the accuracy of their findings. The utility of a forecasting model is contingent upon the certainty of its accuracy, or the extent to which it can predict real-world outcomes [51]. It is notable that the majority of published models have not undergone or been subjected to real-world validation. It is reasonable to conclude that models are unlikely to perform as well in real-world samples as they do in derived samples. This discrepancy, or validity shrinkage, is often significant. Consequently, it would be beneficial for future models to include mechanisms for estimating and reporting potential validity shrinkage, as well as predictive validity, in real-world data [52, 53]. External validation, on the other hand, was only used in a few studies that included [25–27]. This is despite the fact that external validation is considered very important for model development and is a key indicator of model performance by highlighting its applicability to participants, centers, regions or environments [54]. It is imperative that external validation be employed during the process of model redevelopment. This entails making adjustments, updates, or recalibrations to the original model based on validation data, with the objective of enhancing its performance [55].

It should be noted that this systematic review is not without limitations. Firstly, the majority of the included studies originate from Asia, which encompasses a multitude of non-English speaking countries. Consequently, this review may have overlooked a substantial corpus of related literature published in other languages. Secondly, the inclusion criteria stipulated the necessity for studies to be derived from primary research in peer-reviewed journals. Consequently, preprints and grey literature, such as conference abstracts, committee and government reports, were excluded. It is therefore possible that some studies may have been omitted from our review.

Conclusion

The forecasting of dengue cases is a valuable resource for policymakers engaged in the formulation of strategies for the prevention of dengue outbreaks, particularly in regions where the disease is endemic. The results of this systematic review indicate that the machine learning method utilizing the random forest algorithm is more effective than others method, particularly in comparison to statistical methods. Furthermore, this systematic review presents evidence of predictors in dengue case experience that focuses on incorporating climatic factors to create an early warning system, which can be utilized as a reference for preventing den-

gue transmission. The findings from this review have the potential to form the basis for more effective modelling practices in the future. These findings will contribute to the development of robust modelling across different settings and populations and have significant implications for planning and decision-making processes for early dengue intervention and prevention.

REFERENCES

1. Sarker R., Roknuzzaman A.S.M., Haque M.A., et al. Upsurge of dengue outbreaks in several WHO regions: Public awareness, vector control activities, and international collaborations are key to prevent spread. *Health Sci. Rep.* 2024;7(4):e2034. DOI: <https://doi.org/10.1002/hsr2.2034>
2. Hossain M.S., Noman A.A., Mamun S.M.A.A., Mosabbir A.A. Twenty-two years of dengue outbreaks in Bangladesh: epidemiology, clinical spectrum, serotypes, and future disease risks. *Trop. Med. Health.* 2023;51(1):37. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41182-023-00528-6>
3. CDC. Dengue on the Rise: Get the Facts. Available at: <https://cdc.gov/dengue/stories/dengue-on-the-rise-get-the-facts.html>
4. Trivedi S., Chakravarty A. Neurological complications of dengue fever. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2022;22(8):515–29. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11910-022-01213-7>
5. Umakanth M., Suganthan N. Unusual manifestations of dengue fever: a review on expanded dengue syndrome. *Cureus.* 2020;12(9):e10678. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.10678>
6. Capeding M.R., Tran N.H., Hadinegoro S.R., et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2014;384(9951):1358–65. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61060-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61060-6)
7. Leung X.Y., Islam R.M., Adhami M., et al. A systematic review of dengue outbreak prediction models: Current scenario and future directions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2023;17(2):e0010631. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010631>
8. Chen H.L., Hsiao W.H., Lee H.C., et al. Selection and characterization of DNA aptamers targeting all four serotypes of dengue viruses. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131240. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131240>
9. Zhu G., Liu J., Tan Q., Shi B. Inferring the spatio-temporal patterns of dengue transmission from surveillance data in Guangzhou, China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(4):e0004633. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004633>
10. Teurlai M., Menkès C.E., Cavarero V., et al. Socio-economic and climate factors associated with dengue fever spatial heterogeneity: a worked example in New Caledonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9(12):e0004211. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004211>
11. Phung D., Talukder M.R., Rutherford S., Chu C. A climate-based prediction model in the high-risk clusters of the Mekong Delta region, Vietnam: towards improving dengue prevention and control. *Trop. Med. Int. Health.* 2016;21(10):1324–33. DOI: <https://doi.org/10.1111/tmi.12754>
12. Medlock J.M., Leach S.A. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infect. Dis.* 2015;15(6):721–30. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70091-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70091-5)
13. Benedum C.M., Seidahmed O.M.E., Eltahir E.A.B., Markuzon N. Statistical modeling of the effect of rainfall flushing on dengue transmission in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(12):e0006935. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006935>
14. Gharbi M., Quenel P., Gustave J., et al. Time series analysis of dengue incidence in Guadeloupe, French West Indies: forecast-

- ing models using climate variables as predictors. *BMC Infect. Dis.* 2011;11:166.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-166>
15. Betanzos-Reyes A.F., Rodríguez M.H., Romero-Martínez M., et al. Association of dengue fever with *Aedes* spp. abundance and climatological effects. *Salud Publica Mex.* 2018;60(1):12–20. DOI: <https://doi.org/10.21149/8141>
16. Gluskin R.T., Johansson M.A., Santillana M., Brownstein J.S. Evaluation of Internet-based dengue query data: Google Dengue Trends. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014;8(2):e2713.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002713>
17. Ogashawara I., Li L., Moreno-Madrinán M.J. Spatial-temporal assessment of environmental factors related to dengue outbreaks in São Paulo, Brazil. *Geohealth.* 2019;3(8):202–17. DOI: <https://doi.org/10.1029/2019GH000186>
18. Anno S., Hara T., Kai H., et al. Spatiotemporal dengue fever hotspots associated with climatic factors in Taiwan including outbreak predictions based on machine-learning. *Geospat. Health.* 2019;14(2). DOI: <https://doi.org/10.4081/gh.2019.771>
19. Baquero O.S., Santana L.M.R., Chiaravalloti-Neto F. Dengue forecasting in São Paulo city with generalized additive models, artificial neural networks and seasonal autoregressive integrated moving average models. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195065. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195065>
20. Racloz V., Ramsey R., Tong S., Hu W. Surveillance of dengue fever virus: a review of epidemiological models and early warning systems. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(5):e1648. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001648>
21. Baharom M., Ahmad N., Hod R., Abdul Manaf M.R. Dengue early warning system as outbreak prediction tool: a systematic review. *Risk Manag. Healthc. Policy.* 2022;15:871–86. DOI: <https://doi.org/10.2147/RMHP.S361106>
22. Aburas H.M., Cetiner B.G., Sari M. Dengue confirmed-cases prediction: A neural network model. *Expert Syst. Appl.* 2010;37(6):4256–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2009.11.077>
23. Chang F.S., Tseng Y.T., Hsu P.S., et al. Re-assess vector indices threshold as an early warning tool for predicting dengue epidemic in a dengue non-endemic country. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9(9):e0004043. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004043>
24. Ahmad Qureshi E.M., Tabinda A.B., Vehra S. Predicting dengue outbreak in the metropolitan city Lahore, Pakistan, using dengue vector indices and selected climatological variables as predictors. *J. Pak. Med. Assoc.* 2017;67(3):416–21.
25. Roster K., Connaughton C., Rodrigues F.A. Machine-learning-based forecasting of dengue fever in Brazilian cities using epidemiologic and meteorological variables. *Am. J. Epidemiol.* 2022;191(10):1803–12. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/kwac090>
26. Mussumeci E., Codeço Coelho F. Large-scale multivariate forecasting models for Dengue – LSTM versus random forest regression. *Spat. Spatiotemporal. Epidemiol.* 2020;35:100372. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sste.2020.100372>
27. Ren H., Xu N. Forecasting and mapping dengue fever epidemics in China: a spatiotemporal analysis. *Infect. Dis. Poverty.* 2024;13(1):50. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-024-01219-y>
28. Nguyen V.H., Tuyet-Hanh T.T., Mulhall J., et al. Deep learning models for forecasting dengue fever based on climate data in Vietnam. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2022;16(6):e0010509. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010509>
29. Page M.J., McKenzie J.E., Bossuyt P.M., et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372:n71. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
30. Lockwood C., Munn Z., Porritt K. Qualitative research synthesis: methodological guidance for systematic reviewers utilizing meta-aggregation. *Int. J. Evid. Based Healthc.* 2015;13(3):179–87. DOI: <https://doi.org/10.1097/XEB.0000000000000062>
31. Moons K.G., Altman D.G., Reitsma J.B., et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration. *Ann. Intern. Med.* 2015;162(1):W1–73. DOI: <https://doi.org/10.7326/M14-0698>
32. Collins G.S., Reitsma J.B., Altman D.G., Moons K.G. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD statement. *Ann. Intern. Med.* 2015; 162(1): 55–63. DOI: <https://doi.org/10.7326/M14-0697>
33. Koplewitz G., Lu F., Clemente L., et al. Predicting dengue incidence leveraging internet-based data sources. A case study in 20 cities in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2022;16(1):e0010071. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010071>
34. Lima M.V.M., Laporta G.Z. Evaluation of the models for forecasting dengue in Brazil from 2000 to 2017: An ecological time-series study. *Insects.* 2020;11(11):794. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11110794>
35. Sang S., Gu S., Bi P., et al. Predicting unprecedented dengue outbreak using imported cases and climatic factors in Guangzhou, 2014. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9(5):e0003808. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003808>
36. Kuo C.Y., Yang W.W., Su E.C. Improving dengue fever predictions in Taiwan based on feature selection and random forests. *BMC Infect. Dis.* 2024;24(Suppl. 2):334. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09220-4>
37. Yuan H.Y., Wen T.H., Kung Y.H., et al. Prediction of annual dengue incidence by hydro-climatic extremes for southern Taiwan. *Int. J. Biometeorol.* 2019;63(2):259–68. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00484-018-01659-w>
38. Tuan D.A., Dang T.N. Leveraging climate data for dengue forecasting in Ba Ria Vung Tau Province, Vietnam: An advanced machine learning approach. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2024;9(10):250. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9100250>
39. Ismail S., Fildes R., Ahmad R., et al. The practicality of Malaysia dengue outbreak forecasting model as an early warning system. *Infect. Dis. Model.* 2022;7(3):510–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idm.2022.07.008>
40. Karasinghe N., Peiris S., Jayatilaka R., Dharmasena T. Forecasting weekly dengue incidence in Sri Lanka: Modified Autoregressive Integrated Moving Average modeling approach. *PLoS One.* 2024;19(3):e0299953. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299953>
41. Chakraborty T., Chattopadhyay S., Ghosh I. Forecasting dengue epidemics using a hybrid methodology. *Phys. A: Stat. Mech. Appl.* 2019;527:121266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.121266>
42. Baharom M., Ahmad N., Hod R., Abdul Manaf M.R. Dengue early warning system as outbreak prediction tool: a systematic review. *Risk Manag. Healthc. Policy.* 2022;15:871–86. DOI: <https://doi.org/10.2147/RMHP.S361106>
43. Ilic I., Ilic M. Global patterns of trends in incidence and mortality of dengue, 1990–2019: An analysis based on the global burden of disease study. *Medicina (Kaunas).* 2024;60(3):425. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina60030425>
44. Nayak S.D.P., Narayan K.A. Prediction of dengue outbreaks in Kerala state using disease surveillance and meteorological data. *Int. J. Community Med. Public Health.* 2019;6(10):4392. DOI: <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20194500>
45. Liu D., Guo S., Zou M., et al. A dengue fever predicting model based on Baidu search index data and climate data in South China. *PLoS One.* 2019;14(12):e0226841. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226841>
46. Johansson M.A., Reich N.G., Hota A., et al. Evaluating the performance of infectious disease forecasts: A comparison of climate-driven and seasonal dengue forecasts for Mexico. *Sci. Rep.* 2016;6:33707. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep33707>

47. Salim N.A.M., Wah Y.B., Reeves C., et al. Prediction of dengue outbreak in Selangor Malaysia using machine learning techniques. *Sci. Rep.* 2021;11(1):939.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79193-2>
48. Bullock J., Luccioni A., Hoffman Pham K., et al. Mapping the landscape of Artificial Intelligence applications against COVID-19. *J. Artif. Intell. Res.* 2020;69:807–45.
DOI: <https://doi.org/10.1613/jair.1.12162>
49. Zinszer K., Verma A.D., Charland K., et al. A scoping review of malaria forecasting: past work and future directions. *BMJ Open.* 2012;2(6):e001992.
DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001992>
50. Ong J., Liu X., Rajarethinam J., et al. Mapping dengue risk in Singapore using Random Forest. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(6):e0006587.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006587>
51. Johansson M.A., Apfeldorf K.M., Dobson S., et al. An open challenge to advance probabilistic forecasting for dengue epidemics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019;116(48):24268–74.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1909865116>
52. Ivanescu A.E., Li P., George B., et al. The importance of prediction model validation and assessment in obesity and nutrition research. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 2016;40(6):887–94.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.214>
53. Steyerberg E.W., Lingsma H.F. Predicting citations: Validating prediction models. *BMJ.* 2008;336(7648):789.
DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.39542.610000.3A>
54. Moons K.G., de Groot J.A., Bouwmeester W., et al. Critical appraisal and data extraction for systematic reviews of prediction modelling studies: the CHARMS checklist. *PLoS Med.* 2014;11(10):e1001744.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001744>
55. Moons K.G., Kengne A.P., Grobbee D.E., et al. Risk prediction models: II. External validation, model updating, and impact assessment. *Heart.* 2012;98(9):691–8.
DOI: <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2011-301247>

Information about the authors

Agung Sutriyawan — researcher, Diponegoro University, Diponegoro, Indonesia; Head, Department of public health, Faculty of health sciences, Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia, agung.epid@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6119-6073>

Mursid Rahardjo — senior researcher, Department of environmental health, Faculty of public health, Diponegoro University, Diponegoro, Indonesia, mursidraharjo@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4791-1242>

Martini Martini — senior researcher, Department of epidemiology, Faculty of public health, Diponegoro University, Diponegoro, Indonesia, martini@live.undip.ac.id, <https://orcid.org/0000-0002-6773-1727>

Dwi Sutiningsih — senior researcher, Department of epidemiology, Faculty of public health, Diponegoro University, Diponegoro, Indonesia, dwi.sutiningsih@live.undip.ac.id, <https://orcid.org/0000-0002-4128-6688>

Cheerawit Rattanapan — senior researcher, ASEAN Institute for Health Development, Mahidol University, Bangkok, Thailand, cheerawit.rat@mahidol.ac.th, <https://orcid.org/0000-0002-1799-422X>

Nur Faeza Abu Kassim — senior researcher, School of biological sciences, University of Science Malaysia, Penang, Malaysia, nurfaeza@usm.my, <https://orcid.org/0000-0001-6620-8603>

Authors' contribution: Agung Sutriyawan — conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, writing of original draft, review and editing; Mursid Rahardjo — conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, resources, writing of original draft, review and editing; Martini Martini — formal analysis, investigation, methodology, resources, writing of original draft, review and editing, project administration; Dwi Sutiningsih — methodology, resources, writing of original draft, review and editing, project administration, supervision, validation; Cheerawit Rattanapan — formal analysis, investigation, resources, writing of original draft, review and editing, project administration, supervision, validation; Nur Faeza Abu Kassim — conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, writing of original draft, review and editing, project administration, resources, supervision, validation, visualization. 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 21.03.2025;
accepted for publication 30.05.2025;
published 28.06.2025

Информация об авторах

Agung Sutriyawan — научный сотрудник Diponegoro University, Semarang, Indonesia; зав. каф. общественного здравоохранения факультета медицинских наук Bhakti Kencana University, Bandung, Indonesia, agung.epid@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6119-6073>

Mursid Rahardjo — с. н. с. каф. гигиены окружающей среды факультета общественного здравоохранения Diponegoro University, Semarang, Indonesia, mursidraharjo@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4791-1242>

Martini Martini — с. н. с. каф. эпидемиологии факультета общественного здравоохранения Diponegoro University, Semarang, Indonesia, martini@live.undip.ac.id, <https://orcid.org/0000-0002-6773-1727>

Dwi Sutiningsih — с. н. с. каф. эпидемиологии факультета общественного здравоохранения Diponegoro University, Semarang, Indonesia, dwi.sutiningsih@live.undip.ac.id, <https://orcid.org/0000-0002-4128-6688>

Cheerawit Rattanapan — с. н. с. Института развития здравоохранения ACEAH, Mahidol University, Bangkok, Thailand, cheerawit.rat@mahidol.ac.th, <https://orcid.org/0000-0002-1799-422X>

Nur Faeza Abu Kassim — с. н. с. Школы биологических наук Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia, nurfaeza@usm.my, <https://orcid.org/0000-0001-6620-8603>

Вклад авторов: Agung Sutriyawan — концептуализация, сбор данных, формальный анализ, привлечение финансирования, исследование, методология, написание первоначального проекта, рецензирование и редактирование; Mursid Rahardjo — концептуализация, сбор данных, формальный анализ, исследование, методология, ресурсы, написание первоначального проекта, рецензирование и редактирование; Martini Martini — формальный анализ, расследование, методология, ресурсы, написание первоначального проекта, рецензирование и редактирование, администрирование проекта, надзор, валидация; Cheerawit Rattanapan — формальный анализ, расследование, ресурсы, написание первоначального проекта, рецензирование и редактирование, администрирование проекта, надзор, валидация; Nur Faeza Abu Kassim — концептуализация, сбор данных, формальный анализ, расследование, написание оригинального проекта, рецензирование и редактирование, администрирование проекта, ресурсы, надзор, валидация, визуализация. Все авторы подтверждают, что они соответствуют критериям авторства Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в разработку концепции статьи, сбор, анализ и интерпретацию данных для статьи, составление и редактирование статьи, а также окончательно утвердили версию, которая будет опубликована.

Статья поступила в редакцию 21.03.2025;
принята к публикации 30.05.2025;
опубликована 28.06.2025



Полногеномное секвенирование двух клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с фенотипической чувствительностью к рифампицину при прогнозируемой Xpert MTB/RIF устойчивости

Огарков О.Б.^{1✉}, Синьков В.В.¹, Кухтина Т.А.², Жданова С.Н.¹, Кондратов И.Г.¹

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

²Иркутская областная клиническая туберкулёзная больница, Иркутск, Россия

Аннотация

Введение. Более 40% штаммов *Mycobacterium tuberculosis* устойчивы к рифампицину (RIF) и изониазиду — препаратам первого ряда. Возбудитель туберкулёза приобретает устойчивость к RIF главным образом за счёт мутаций в гене *rpoB*.

Цель исследования — поиск наиболее вероятных компенсаторных мутаций в генах *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, кодирующих α-, β- и β'-субъединицы РНК-полимеразы *M. tuberculosis*.

Материалы и методы. Перекрестный анализ фенотипической и генетической устойчивости к RIF среди 2298 клинических штаммов *M. tuberculosis* выявил 8 случаев, когда устойчивость, определённая тестом Xpert Ultra MTB/RIF, не подтверждалась бактериологическим методом. Во всех случаях это были хронические больные туберкулёзом с множественной или широкой лекарственной устойчивостью, у которых был отменён RIF по причине обнаружения устойчивости к этому препарату у выделенного штамма. Для исследования генотипа, секвенирования по Сэнгеру и полногеномного секвенирования были получены 2 штамма.

Результаты. Повторный тест Xpert Ultra MTB/RIF, секвенирование по Сэнгеру и полногеномное секвенирование выявили наличие единственной мутации *S450L* в гене *rpoB* при наличии фенотипической чувствительности у обоих штаммов. При филогенетическом анализе выяснено, что оба генома принадлежали к генотипу Beijing B0/W148. Штаммы отличались более высокой скоростью роста, чем другие изоляты. Выявлены две потенциальные компенсаторные мутации *V483G* и *H748P* в гене *rpoC* при отсутствии других значимых изменений в генах *rpoA* и *rpoB*.

Заключение. Высказано предположение, что феномен расхождения бактериологических и молекулярно-генетических результатов связан с приобретением в процессе лечения RIF штаммами Beijing B0/W148 компенсаторных мутаций в гене *rpoC*, а выявленные мутации влияют на конформацию β'-субъединицы, восстанавливая эффективность транскрипции, вызванную мажорной мутацией *S450L*.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing B0/W148, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, компенсаторные фитнес-мутации

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном письменном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (протокол № 2 от 18.02.2020).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 121022500179-0 с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека.

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

Для цитирования: Огарков О.Б., Синьков В.В., Кухтина Т.А., Жданова С.Н., Кондратов И.Г. Полногеномное секвенирование двух клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с фенотипической чувствительностью к рифампицину при прогнозируемой Xpert MTB/RIF устойчивости. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):343–349.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-644>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-644>

Whole-genome sequencing of two clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility to rifampicin but predicted resistance by Xpert MTB/RIF

Oleg B. Ogarkov¹✉, Viacheslav V. Sinkov¹, Tuyana A. Kuhtina²,
Svetlana N. Zhdanova¹, Ilya G. Kondratov¹

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

²Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Irkutsk, Russia

Abstract

Introduction. More than 40% of *Mycobacterium tuberculosis* strains are resistant to rifampicin (RIF) and isoniazid, the first-line drugs. The tuberculosis pathogen becomes resistant to RIF mainly due to mutations in the *rpoB* gene. **The aim** of the study was to search for the most probable compensatory mutations in the *rpoA*, *rpoB* and *rpoC* genes encoding α -, β - and β' -subunits of *M. tuberculosis* RNA polymerase.

Materials and methods. A cross-sectional analysis of phenotypic and genetic resistance to RIF among 2298 clinical strains of *M. tuberculosis* revealed 8 cases in which resistance as determined by the Xpert Ultra MTB/RIF test was not confirmed bacteriologically. In all cases, these were chronic multidrug-resistant or extensively drug-resistant *M. tuberculosis* patients in whom RIF was discontinued due to the detection of resistance to this drug in the isolated strains. Two strains were obtained for genotype testing, Sanger sequencing and whole-genome sequencing.

Results. Repeat Xpert Ultra MTB/RIF test, Sanger sequencing and whole genome sequencing revealed the presence of a single S450L mutation in the *rpoB* gene with phenotypic sensitivity in both strains. Phylogenetic analysis revealed that both genomes belonged to the Beijing B0/W148 genotype. The strains were characterized by a higher growth rate than the other isolates. Two potential compensatory mutations V483G and H748P in the *groC* gene were identified in the absence of other significant changes in the *rpoA* and *rpoB* genes.

Conclusion. It is suggested that the phenomenon of discrepancy between results of bacteriological and molecular genetic tests is associated with the acquisition of compensatory mutations in the *groC* gene during RIF treatment of Beijing B0/W148 strains, and the identified mutations affect the conformation of the β' -subunit, restoring the transcription efficiency of affected by the major S450L mutation.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing B0/W148, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, compensatory fitness mutations

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (protocol No. 2, February 18, 2020).

Funding source. The study was carried out within the framework of the State Assignment No. 121022500179-0 using the equipment from the CCU "Center for Development of Progressive Personalized Health Technologies" of the Scientific Center for Family Health Problems and Human Reproduction.

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

For citation: Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Kuhtina T.A., Zhdanova S.N., Kondratov I.G. Whole-genome sequencing of two clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility to rifampicin but predicted resistance by Xpert MTB/RIF. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):343–349.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-644>

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

Введение

Туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) развивается у больных, которым назначаются рифампицин (RIF) и изониазид — наиболее эффективные противотуберкулёзные препараты (ПТП), называемые также препаратами первого ряда¹. В глобальном масштабе более

40% штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) становятся МЛУ или как минимум устойчивыми к RIF. RIF связывается близко к активному сайту в субъединице β (ген *rpoB*) фермента РНК-полимеразы бактерий [1] в области, определяющей устойчивость к RIF (RRDR). Связывание RIF с RRDR стерически затрудняет элонгацию вновь синтезируемой РНК, что в конечном итоге блокирует синтез белков микробной клеткой. У МБТ нет известного механизма горизонтального переноса генов, устойчивость RIF в основном возникает из-за хромосомных мутаций в пределах RRDR [2]. Плата за устой-

¹ WHO. Global tuberculosis report 2024. Geneva: World Health Organization; 2024. URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>

чивость к RIF весьма высока и выражается у МБТ в большинстве случаев в снижении скорости роста и меньшей конкурентоспособности RIF-устойчивых мутантов относительно предковых чувствительных форм [3]. Однако замечено, что формы МБТ с низкой приспособленностью могут со временем частично или полностью восстанавливать фенотипические свойства, в частности увеличивать скорость роста за счёт появления так называемых компенсаторных мутаций [4]. Идентификация компенсаторных мутаций весьма сложна и зависит от используемой методики.

Молекулярно-эпидемиологические исследования геномов Beijing B0/W148, относящегося к генетической линии L2 [5, 6], свидетельствуют о том, что более 95% клинических штаммов этого генотипа содержат мутации в RRDR и являются одним из ключевых факторов эпидемического распространения туберкулёза с первичной лекарственной устойчивостью к RIF в России [6, 7]. Практически 90% этих штаммов несут наиболее распространённую аминокислотную замену *S450L* (нуклеотидная замена С→Т в 761155-й позиции генома) [6], при этом отмечено, что генетическая цена этой замены в RRDR гена *rpoB* для мутантов — наименьшая [2].

Цель исследования: поиск наиболее вероятных компенсаторных мутаций в генах *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, кодирующих α-, β- и β'-субъединицы РНК-полимеразы МБТ, вызывающих появление феномена фенотипической чувствительности к RIF.

Материалы и методы

Проведён ретроспективный перекрёстный анализ Xpert Ultra MTB/RIF и фенотипических бактериологических результатов за 2022 г., полученных в лабораторном отделении Иркутской областной клинической туберкулёзной больницы. Исследование проводилось при добровольном информированном письменном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (протокол № 2 от 18.02.2020).

Исследовано 2298 образцов, из них 529 чувствительных к RIF, 363 — устойчивых; у 90 чувствительность к RIF при использовании Xpert Ultra MTB/RIF не определена. Основная причина отсутствия положительного результата ПЦР — низкая концентрация мишени при проведении Xpert

Ultra MTB/RIF. В 8 случаях устойчивость, определяемая тестом Xpert Ultra, в мокроте не была подтверждена бактериологическими методами. Во всех случаях это были хронические больные туберкулёзом с МЛЮ или широкой лекарственной устойчивостью, которым был отменён RIF по причине наличия или приобретения устойчивости к этому препарату у ранее выделенного штамма.

Для проведения повторного Xpert Ultra MTB/RIF, исследования генотипа, секвенирования по Сэнгеру и полногеномного секвенирования (WGS) были получены 2 штамма (табл. 1). Выделение ДНК, приготовление библиотек, WGS и биоинформатический, филогенетический и статистический анализ проводили, как описано ранее [6]. Первичные нуклеотидные последовательности депонированы в биопроект PRJNA1215569 NCBI. Устойчивость к ПТП определяли на бактериологическом анализаторе «BD Bactec» («Becton Dickinson») и на среде Левенштейна–Йенсена согласно Приказу Минздрава России от 21.03.2003 № 109 (ред. от 05.06.2017). Генетическую гетерорезистентность в отдельных позициях генома определяли по числу альтернативных коротких прочтений при проведении WGS, как описано ранее [8].

Вероятность замены аминокислот в обнаруженных мутациях была исследована с использованием двух подходов: ПАМ-матриц (Point Accepted Mutation matrices) — PAM30 и PAM250 [9] и алгоритма SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) для предсказания аминокислотных замен, влияющих на функцию белка [10].

Результаты

Повторный тест Xpert Ultra MTB/RIF, секвенирование по Сэнгеру и WGS выявили наличие единственной мутации *S450L* в гене *rpoB* при наличии фенотипической чувствительности у обоих штаммов. При филогенетическом анализе выяснено, что оба генома принадлежат к генотипу Beijing B0/W148. Штаммы отличались более высокой скоростью роста, чем другие изоляты. После выяснения генотипической принадлежности исследуемых штаммов к генотипу Beijing B0/W148 в качестве модельных геномов были использованы 513 полных геномов B0/W148 из онлайн-сервиса Short Read Archive (NCBI), опубликованных в период с 1995 по 2020 г. для штаммов из Северной Евразии.

Таблица 1. Характеристика изолятов *M. tuberculosis*

№	Группа учёта больного	ВИЧ	Лекарственная устойчивость	Генотип
Irk1	Неэффективный курс лечения туберкулёза	+	К изониазиду, RIF*, капреомицину, пипразинамиду, протианамиду, бедаквилину, линезолиду	Beijing B0/W148
Irk2	Рецидив туберкулёза	—	К изониазиду, RIF*, этамбутолу, капреомицину, пипразинамиду, левофлоксацину, бедаквилину, линезолиду	Beijing B0/W148

Примечание. *По результатам Xpert Ultra MTB/RIF, но не микробиологического теста.

Таблица 2. Наличие мутаций 1, 2 и 3-го уровней значимости [11]

Ген	Мутации 1-го уровня значимости	Мутации 2-го уровня значимости	Мутации 3-го уровня значимости
<i>rpoB</i>	L430P; Q432P; D435V; D435Y; H445D; H445L; S450L; L452P; H723D	T427A; S431R	P45S; G79S; V305I; G376V; T400A; P454S; I491M; V496A; L554P; Y564H; S672Y; L731P; V800A; R827C; R827L; H835P; G836S; K891E; Q980K; R1008C
<i>rpoC</i>	Нет	E187G; G311R; G332S; G433C; P434A; P434L; K445R; L449R; F452C; V483G; D485N; E488Q; I491V; I491T; L507V; L516P; V517L; G519S; A521D; Q523E; H525N; L527V; L558L; Y586H; Q693H; N698H; N698S; N698K; E702K; D735N; D735E; D747A; H748P; E757A; R770H; T812I; S838C; D943N; D943G; M983I; P1040S; P1040R; I1046M; V1147A; K1152N	Нет
<i>rpoA</i>	Нет	G31C; R153R; T187P; V183A; R182Q	Нет

Для этого набора геномов всего обнаружено 34 миссенс-мутаций в гене *rpoB* [11]. Мутации 1-го уровня значимости были в 9 вариантах; 2-го уровня — в 2; 3-го уровня — в 20 (табл. 2). Также в гене *rpoB* были обнаружены 3 мутации, отсутствующие в описании каталога ВОЗ: E82G, I90M, R219G. В гене *rpoC* обнаружены 45 миссенс-мутаций, все они относились к мутациям 2-го уровня значимости (табл. 1). В гене *rpoA* обнаружено только 5 миссенс-мутаций, также относящихся к мутациям 2-го уровня значимости (табл. 1).

В 2 исследованных штаммах обнаружены следующие комбинации мутаций. В штамме Irk1 *rpoB* — S450L; *rpoC* — H748P; в штамме Irk2 *rpoB* — S450L; *rpoC* — V483G. Интересно, что аналогичный случай лекарственной чувствительности при наличии комбинации мутаций *rpoB* — S450L; *rpoC* — V483G был описан в 2024 г. у штамма Евро-Американской линии (4.2.2.2.1) [12]. Однако авторы предположили, что полученный результат является лабораторной ошибкой, связанной с использованием завышенных концентраций RIF при тестировании. Мутация H748P в гене *rpoC* в окончательной версии статьи не рассматривается как компенсаторная, хотя она была описана в качестве таковой в исходной рукописи этих же авторов² [12].

Тестируемые геномы Irk1 и Irk2 занимают наиболее высокие позиции по значениям гетерорезистентности (214 и 212) в позиции 761155 (нуклеотидная замена *rpoB* — S450L; рисунок). Наибольшая гетерорезистентность (235), выражающаяся в наличии альтернативных коротких прочтений при WGS на исследуемую позицию, наблюдалась только у одного генома из Якутии, выделенного в 2013 г. Проведено исследование вероятности появления обнаруженных замен аминокислот в гене *rpoC* с использованием двух подходов: ПАМ-матриц (Point Accepted Mutation matrices) — ПАМ30 и ПАМ250 [9] и алгоритма SIFT (Sorting Intolerant

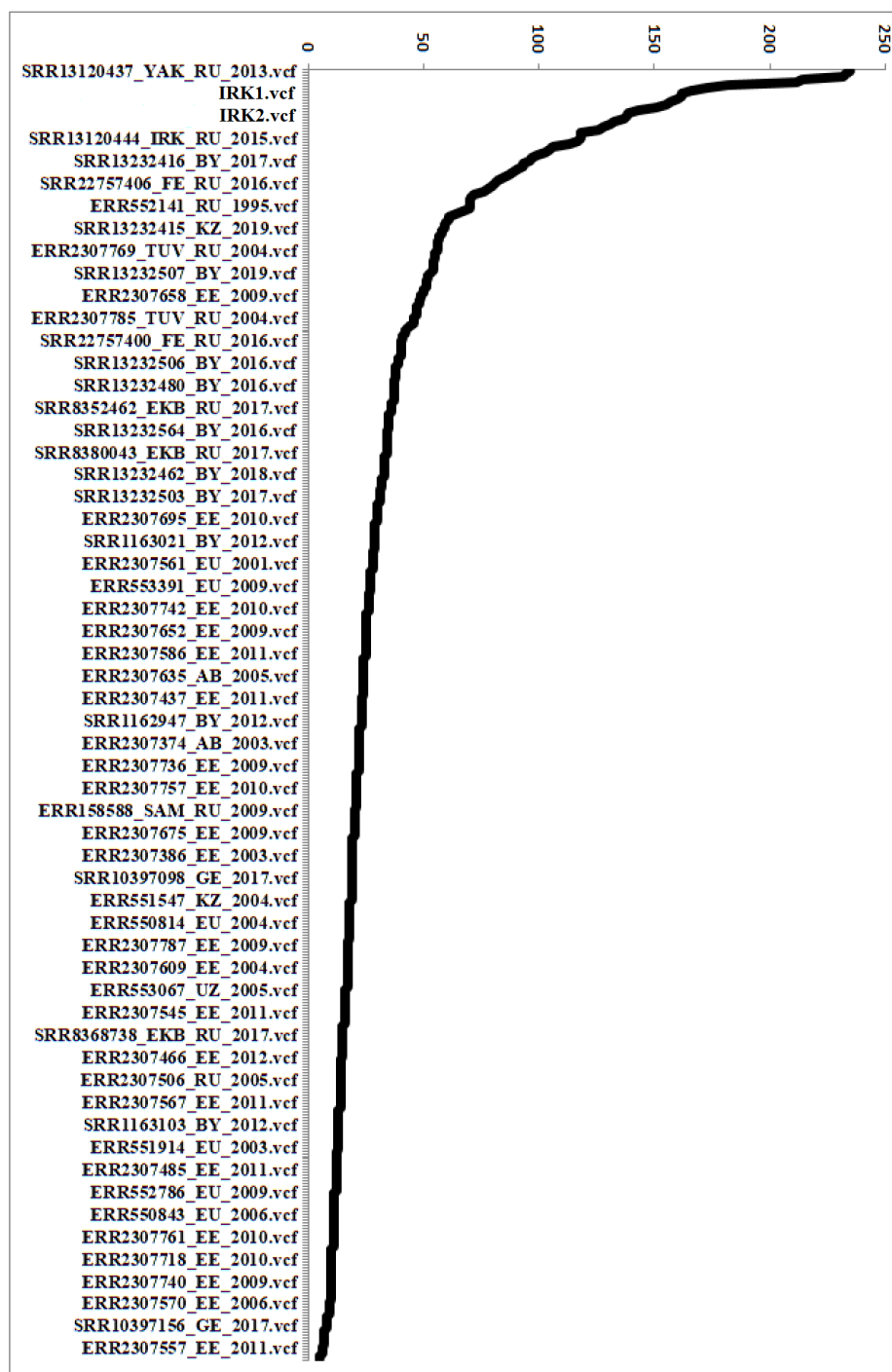
From Tolerant) [10]. Для предсказания аминокислотных замен, влияющих на функцию белка, ПАМ-матрицы использовали для оценки вероятности замены аминокислот в процессе эволюции [9]. Алгоритмом SIFT определяли, влияют ли аминокислотные замены на функцию белка, используя эволюционную информацию и выравнивание гомологичных последовательностей [10].

Для V483G (IRK2) получено значение SIFT 0,00 указывающее на низкую толерантность, что может свидетельствовать о значительном влиянии этой замены на функцию β'-субъединицы РНК-полимеразы. Однако умеренные значения ПАМ10 (0) и ПАМ250 (–1) предполагают, что эта мутация не приводит к полной потере функции и может стабилизировать комплекс РНК-полимеразы, компенсируя дестабилизацию, вызванную S450L. В свою очередь, мутация H748P (IRK1) с SIFT 0,05 и ПАМ250 (–3) демонстрирует умеренную толерантность, что указывает на небольшое негативное воздействие на белок. Можно предположить, что указанные мутации влияют на конформацию β'-субъединицы, восстанавливая эффективность транскрипции, вызванную мажорной мутацией S450L, где V483G может играть более выраженную компенсаторную роль.

Обсуждение

Феномен появления «чувствительности» у штаммов наблюдался нами и ранее в рамках двух международных проектов [8] при последовательном определении минимальной ингибирующей концентрации у штаммов МБТ от одного больного. Было неоднократно замечено (данные не опубликованы), что отмена некоторых ПТП, в том числе RIF, ведёт к уменьшению минимальной ингибирующей концентрации вплоть до значений «пограничной чувствительности», определяемой производителем наборов «Sensititre MYCOTB» («TREK Diagnostics»). Основной гипотезой, которая могла бы объяснить этот феномен, было предположение, что в популяции возбудителя после отмены ПТП из пула персистеров начинают более активно раз-

² URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.22.481565v1.full.pdf>



Оценка гетерорезистентности выборки из 515 геномов в позиции 761155 (нуклеотидная замена *groB* — *S450L*).

множаться чувствительные к данному антибиотику клоны [8]. Генотип Beijing B0/W148, более чем в 95% случаев несёт устойчивость к RIF при первичном заражении, т. е. все необходимые компенсаторные мутации для выживания вне организма он уже получил в процессе эволюции. Ключевой вопрос: какие фитнес-мутации приводят к появлению феномена «чувствительности» на фоне наличия мажорной мутации *groB* — *S450L*? Обнаруженные нами миссенс-мутации *V483G* и *H748P* в гене

groC при отсутствии других значимых изменений в генах *groA* и *groB* могут свидетельствовать о том, что отмена некоторых ПТП может приводить к появлению компенсаторных фитнес-мутаций, проявляющихся как «чувствительность» к ПТП при наличии основной замены, определяемой при проведении клинической ПЦР. Можно также предположить, что на фоне высокой гетерогенности по гену *groB* в популяции возбудителя описываемая комбинация мутаций *S450L* совместно с *V483G/H748P*

находится под действия стабилизирующего отбора только на фоне лечения RIF. Отмена RIF приводит к постепенному возвращению популяции возбудителя к более устойчивой модели, при которой клоны, содержащие *V483G/H748P* и другие фитнес-мутации, элиминируются. Источником этого являются персисторы с *S450L*, но без мутаций в гене *rpoC*.

Выводы

Можно предположить, что феномен расхождения бактериологических и молекулярно-генетических результатов связан с приобретением в процессе лечения RIF штаммами Beijing B0/W148 компенсаторных мутаций в гене *rpoC*. Выявленные мутации влияют на конформацию β'-субъединицы, восстанавливая эффективность транскрипции, вызванную мажорной мутацией *S450L*. Необходимы дальнейшие исследования феномена уменьшения устойчивости к ПТП у возбудителя туберкулеза после его отмены.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Lin W., Mandal S., Degen D., et al. Structural basis of *Mycobacterium tuberculosis* transcription and transcription inhibition. *Mol. Cell.* 2017;66(2):169–79.e8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.001>
- Brunner V.M., Fowler P.W. Compensatory mutations are associated with increased *in vitro* growth in resistant clinical samples of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Genom.* 2024;10(2): 001187. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001187>
- Gagneux S., Long C.D., Small P.M., et al. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2006;312(5782):1944–6. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1124410>
- Alame Eman A.K., Guo X., Takiff H.E., Liu S. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2021;129:102091. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102091>
- Merker M., Rasigade J.P., Barbier M., et al. Transcontinental spread and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. *Nat. Commun.* 2022;13(1):5105. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32455-1>
- Синьков В.В., Огарков О.Б. Популяционная структура суб-типа B0/W148 *Mycobacterium tuberculosis*: филогенетический анализ и особенности генотипической лекарственной устойчивости. *Acta Biomedica Scientifica.* 2024;9(4):248–59. Sinkov V.V., Ogarkov O.V. Population structure of the B0/W148 *Mycobacterium tuberculosis* subtype: Phylogenetic analysis and characteristics of genotypic drug resistance. *Acta Biomedica Scientifica.* 2024;9(4):248–59. DOI: <https://doi.org/10.29413/ABS.2024-9.4.27>
- Хромова П.А., Синьков В.В., Савилов Е.Д. и др. Распространение эндемичных субклонов Beijing B0/W148 *M. tuberculosis* на территориях Сибирского и Дальневосточного федеральных округов по результатам полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2020;19(3):41–5. Khromova P.A., Sinkov V.V., Savilov E.D., et al. Dispersal of Beijing b0/w148 *M. tuberculosis* endemic subclones in territories of the Siberia and Far Eastern Federal District by whole genome study. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2020;19(3):41–5. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-3-41-45> EDN: <https://elibrary.ru/anmivn>
- Operario D.J., Koeppel A.F., Turner S.D., et al. Prevalence and extent of heteroresistance by next generation sequencing of multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176522. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181284>
- Dayhoff M.O. A model of evolutionary change in proteins. In: *Atlas of Protein Sequence and Structure.* Vol. 5. Washington; 1972:89–99.
- Ng P.C., Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812–4. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg509>
- Walker T.M., Miotto P., Köser C.U., et al. The 2021 WHO catalogue of *Mycobacterium tuberculosis* complex mutations associated with drug resistance: a genotypic analysis. *Lancet Microbe.* 2022;3(4):e265–73. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00301-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00301-3)
- Conkle-Gutierrez D., Ramirez-Busby S.M., Gorman B.M., et al. Novel and reported compensatory mutations in *rpoABC* genes found in drug resistant tuberculosis outbreaks. *Front. Microbiol.* 2024;8(14):1265390. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1265390>

Информация об авторах

Огарков Олег Борисович[✉] — д-р мед. наук, директор Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, obogarkov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Синьков Вячеслав Владимирович — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. эпидемиологически и социально значимых инфекций Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, vsinkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>

Кухтина Туяна Анандуевна — врач-бактериолог, зав. бактериологической лабораторией Иркутской областной клинической туберкулезной больницы, Иркутск, Россия, tuyanatsta@mail.ru

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

Кондратов Илья Геннадьевич — канд. биол. наук, н. с. лаб. эпидемиологически и социально значимых инфекций Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия, kondratovig@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Information about the authors

Oleg B. Ogarkov[✉] — Dr. Sci. (Med.), Director, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, obogarkov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Viacheslav V. Sinkov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of epidemiologically and socially significant infections, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, vsinkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>

Tatyana A. Kuhtina — bacteriologist, Head, Bacteriological laboratory, Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Irkutsk, Russia, tuyanatsta@mail.ru

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

Ilya G. Kondratov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of epidemiologically and socially significant infections, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia, kondratovig@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Участие авторов: *Огарков О.Б.* — идея исследования, концептуализация, дизайн исследования, выбор методов и подходов, сбор и анализ данных, обработка и интерпретация результатов, написание рукописи; *Синьков В.В.* — концептуализация, дизайн исследования, выбор методов и подходов, анализ данных, обработка и интерпретация результатов; *Жданова С.Н.* — дизайн исследования, выбор методов и подходов, анализ данных; *Кухтина Т.А., Кондратов И.Г.* — сбор и анализ данных. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 01.02.2025;
принята к публикации 20.04.2025;
опубликована 28.06.2025

Authors' contribution: *Ogarkov O.B.* — research idea, conceptualization, research design, choice of methods and approaches, data collection and analysis, processing and interpretation of results, writing a manuscript; *Sinkov V.V.* — conceptualization, research design, choice of methods and approaches, data analysis, processing and interpretation of results; *Zhdanova S.N.* — research design, selection of methods and approaches, data analysis; *Kukhtina T.A., Kondratov I.G.* — data collection and 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 01.02.2025;
accepted for publication 20.04.2025;
published 28.06.2025

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-646>



Изучение патогенного потенциала и возможности межвидового перехода вирусов гриппа птиц подтипа H5, выявленных на территории России в 2018–2022 годах

Зиняков Н.Г., Грехнева А.Д.[✉], Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А., Козлов А.А., Никонова З.Б., Жестков П.Д., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А.

Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия

Аннотация

Введение. Высокая скорость эволюции вирусов высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП), обусловленная антигенным дрейфом и реассортацией, может привести к устойчивой репликации и передаче вируса млекопитающим, что наблюдается в популяциях животных в последние годы. Исследование маркеров патогенности для млекопитающих у циркулирующих вирусов ВПГП даёт возможность оценить их патогенный потенциал и способность к межвидовому переходу.

Цель работы — провести анализ геномных последовательностей изолятов вируса гриппа птиц (ВГП) подтипа H5, выявленных на территории России в 2018–2022 гг.

Материалы и методы. В работе использованы результаты собственного полногеномного секвенирования и нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВГП подтипа H5, опубликованные в открытых базах данных.

Результаты. Установлено, что преобладают вирусы с репликативным комплексом, адаптированным к размножению в клетках птиц. Анализ аминокислотной последовательности вирусного гемагглютинаина выявил доминирование в рецептор-связывающем сайте белка аминокислот, характерных для ВГП и обеспечивающих повышенное сродство к рецепторам SAα-2,3-Gal эпителиальных клеток птиц. Показано появление и распространение в популяции ВГП факторов вирулентности для млекопитающих, таких как полноразмерный активный белок PB1-F2, дополнительная вставка из 5 аминокислот в белке NS1 и аминокислотные замены в белке M1.

Заключение. Наличие в популяции ВГП факторов патогенности для млекопитающих может способствовать успешному межвидовому переходу вируса за счёт подавления отдельных элементов иммунной защиты с последующей адаптацией вирусного гемагглютинаина к клеточным рецепторам млекопитающих в результате антигенного дрейфа с дальнейшим закреплением приобретённых мутаций естественным отбором. Элиминация из популяции ВГП ряда адаптационных мутаций, способствующих размножению ВГП в клетках млекопитающих, подтверждает эффективность стратегии стемпинг аут и запрета на вакцинацию в промышленном птицеводстве в качестве сдерживающего фактора для гриппа птиц как зооантропонозного заболевания.

Ключевые слова: грипп птиц, генетический анализ, аминокислотные замены, адаптационные мутации, межвидовой переход вируса

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 Федерального центра охраны здоровья животных (протокол № 17 от 24.04.2023).

Источник финансирования. Работа выполнена за счёт средств гранта от Министерства образования и науки № 075-15-2021-1054 от 29.09.2021.

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

Для цитирования: Зиняков Н.Г., Грехнева А.Д., Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А., Козлов А.А., Никонова З.Б., Жестков П.Д., Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. Изучение патогенного потенциала и возможности межвидового перехода вирусов гриппа птиц подтипа H5, выявленных на территории России в 2018–2022 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):350–361.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-646>

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

Investigation of the pathogenic potential and the possibility of cross-species transmission of H5 avian influenza viruses detected on the territory of the Russian Federation in 2018–2022

Nikolay G. Zinyakov, Alena D. Grekhneva[✉], Artem V. Andriyasov, Evgeniya V. Ovchinnikova, Nelli A. Guseva, Anton A. Kozlov, Zoya B. Nikonova, Pavel D. Zhestkov, Dmitry B. Andreychuk, Ilya A. Chvala

Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia

Abstract

Introduction. The rapid evolution of highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses through antigenic drift and reassortment can lead to enhanced replication efficiency and cross-species transmission to mammals, as evidenced by recent outbreaks in various animal populations. Identifying mammalian pathogenicity markers in circulating HPAI viruses is crucial for evaluating their pathogenic potential and ability to cross species barriers.

The aim. This study analyzed genomic sequences of highly pathogenic H5 avian influenza virus (AIV) isolates collected in the Russian Federation between 2018 and 2022.

Materials and methods. We utilized original complete genome sequencing data alongside with nucleotide sequences of H5 AIV isolates and strains available in public databases.

Results. Analysis revealed a predominance of viruses with replication complexes adapted to avian cells. Examination of viral hemagglutinin amino acid sequences showed that most strains maintained receptor-binding sites of avian origin, with enhanced affinity for SA α -2,3-Gal receptors present in avian epithelial cells. However, we identified several mammalian virulence factors that have emerged and spread within the avian influenza virus population, including full-length active PB1-F2 protein, a 5-amino-acid insertion in the NS1 protein, and specific amino acid substitutions in the M1 protein.

Conclusion. The presence of mammalian pathogenicity factors in the avian influenza virus population may facilitate successful cross-species transmission through suppression of specific immune responses, followed by adaptation of viral hemagglutinin to mammalian cell receptors through antigenic drift and natural selection. The observed elimination of certain adaptive mutations from the avian influenza virus population validates the effectiveness of stamping-out policies and vaccination restrictions in industrial poultry farming as important measures to mitigate the zoonotic potential of avian influenza.

Keywords: *avian influenza, genetic analysis, amino acid substitutions, adaptive mutations, cross-species transmission of the virus*

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 Federal Centre for Animal Health (protocol No. 17, April 24, 2023).

Funding source. The work was carried out at the expense of a grant from the Ministry of Education and Science No. 075-15-2021-1054 dated 09/29/2021.

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

For citation: Zinyakov N.G., Grekhneva A.D., Andriyasov A.V., Ovchinnikova E.V., Guseva N.A., Kozlov A.A., Nikonova Z.B., Zhestkov P.D., Andreychuk D.B., Chvala I.A. Investigation of the pathogenic potential and the possibility of cross-species transmission of H5 avian influenza viruses detected on the territory of the Russian Federation in 2018–2022. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):350–361.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-646>

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

Введение

Вирус гриппа птиц (ВГП) является возбудителем опасной высококонтагиозной болезни домашних и диких птиц, характеризующейся преимущественно поражением органов дыхания и пищеварительного тракта. В случае инфицирования вирусами высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП) подтипов H5 или H7 гибель птиц достигает 100%. В 1996 г.

в Китае был обнаружен вирус гриппа подтипа H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996, который впоследствии был признан основоположником генетической линии ВПГП Gs/Gd/96. Со временем изоляты вирусов этой генетической линии получили широкое распространение не только в странах Азии, но и по всему миру. Так, с 2005 по 2007 г. вспышки болезни, вызванные этим подтипом вируса, нанесли зна-

чительный ущерб птицеводству России. С 2014 г. на территории России выявляли в том числе вирус ВПГП подтипа H5N8, с 2016 г. — подтипа H5N5, с 2018 г. — подтипа H5N6. В 2018–2019 гг. вспышки ВПГП (подтипы H5N1, H5N6 и H5N8) регистрировали среди дикой и домашней птицы в странах Азии и Африки, на территории России — в Центральном, Южном, Приволжском и Дальневосточном федеральных округах, в том числе у сельскохозяйственных птиц на птицефабриках (подтип H5N8). В 2020 г. ВПГП H5N8 широко распространился в странах Европы и Ближнего Востока, на территории России и Казахстана [1, 2]. Кроме того, в Омской, Ростовской, Астраханской областях выявляли ВПГП подтипа H5N5. В конце 2020 г. вирус H5N8 был выявлен у людей, контактировавших с больной птицей на птицефабрике Астраханской области [3, 4].

В 2021–2022 гг. широкое распространение получил ВПГП подтипа H5N1 — вспышки болезни регистрировали в странах Европы, Азии, Африки и Северной Америки [4]. Большую озабоченность вызвали вспышки гриппа среди млекопитающих, таких как норки, лисицы, морские котики [5–9]. У выделенного вируса были обнаружены замены, которые указывают на адаптацию к размножению в организме млекопитающих. На настоящий момент ВПГП на территории России представлен подтипом H5N1. В августе 2023 г. на территории острова Сахалин был обнаружен мертвый морской котик¹, а исследование патологического материала от животного показало наличие ВПГП подтипа H5N1.

Весной 2024 г. в США впервые выявили вирус ВПГП H5N1 у коров на молочной ферме. Из клинических признаков наблюдались мастит, летаргия, снижение потребления корма, диарея и выделения из носа. С тех пор вирус был выявлен на молочных фермах не менее чем в 13 штатах США, также подтверждено выделение вируса в окружающую среду с молоком. Выявленный вирус отнесли к генетической кладе 2.3.4.4b и генотипу V3.13, циркулирующему у диких и домашних птиц на территории стран Северной Америки с 2021 г. [10, 11]. Через некоторое время вирус ВПГП H5N1 был выявлен у больных и погибших кошек [12] и человека — работника молочной фермы. Вирус, идентифицированный в пробах от человека, имел аминокислотную замену в белке PB2 (E627K), которая связана с вирусной адаптацией к хозяевам-млекопитающим и ранее обнаружена у людей и других млекопитающих, инфицированных вирусами ВПГП H5N1 и другими подтипами ВГП типа А, включая H7N9 и H9N2 [13]. Передача вируса ВПГП от птиц к млекопитающим и затем доказанный межвидовой переход от коров к кошкам и человеку

указывают на существенную угрозу общественному здоровью.

Наличие у вируса гриппа типа А полиосновного сайта протеолитического расщепления белка гемагглютиниона обеспечивает возможность обширного инфекционного процесса, затрагивающего различные органы и ткани, у разных видов животных. Возможность же репликации вируса и противодействие иммунному ответу организма хозяина обеспечивается другими вирусными белками. Ранее различными группами учёных были выявлены специфичные аминокислотные замены, которые обеспечивают возможность репликации в организме млекопитающих, противодействие иммунному ответу и более тяжёлое протекание инфекционного процесса [14–54].

Целью данной работы был анализ генома ВГП, выявленных на территории России, на наличие маркеров патогенности, потенциально способствующих преодолению вирусом межвидового барьера от птиц к млекопитающим и оценке патогенного потенциала циркулирующих вирусов как возбудителей зооантропонозного заболевания.

Материалы и методы

Биоматериал

В работе исследовали изоляты ВГП подтипа H5, выделенные из биоматериала от птиц в ВНИИЗЖ в 2018–2022 гг. В качестве материала использовали вирусосодержащую аллантоисную жидкость эмбрионов кур, свободных от патогенов, или, в случае невозможности выделения вирусов на эмбрионах кур, патологический материал от птиц (клоакальные и трахеальные смывы, 10–20% суспензии органов, приготовленные на основе 0,9% NaCl).

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 Федерального центра охраны здоровья животных (протокол № 17 от 24.04.2023).

Выделение РНК

Выделение суммарной РНК осуществляли с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили в одну стадию с помощью реагентов для амплификации («Синтол») и систем праймеров и зондов для амплификации фрагментов генов *MP* и *HA*.

¹ World Organisation for Animal Health. Event 5191. <https://wahis.woah.org/#/in-event/5191/dashboard>

Реакцию ОТ проводили в две стадии (отжиг праймеров и непосредственно ОТ) с использованием набора реактивов «Maxima H Minus Reverse Transcriptase» (включает RT-буфер и ревертазу Maxima H; «Thermo Fisher Scientific»), ингибитора РНКаз «RiboLock RNase Inhibitor» («Thermo Fisher Scientific»), раствора dNTPs («Синтол»), бидистиллированной воды, свободной от РНКаз, и раствора прямых специфичных сегмент-универсальных праймеров для амплификации всех сегментов ВГП типа А. Классическую ПЦР проводили с использованием реагентов для амплификации («Синтол») и системы специфичных сегмент-универсальных праймеров для амплификации всех сегментов ВГП типа А. Очистку продуктов ПЦР из ПЦР-смеси осуществляли с помощью набора «Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System» («Promega»).

Секвенирование

Полногеномное секвенирование проводили с помощью генетического анализатора «MiSeq» («Illumina») в соответствии с инструкцией к прибору. Для приготовления библиотек использовали коммерческие наборы «Nextera XT» и «Nextera XT Index Kit» («Illumina»).

Нуклеотидные последовательности

В работе использованы результаты собственного полногеномного секвенирования и нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВГП подтипа Н5 из России, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI² и на платформе EpiFlu³ (см. Приложение на сайте журнала <https://microbiol.crie.ru/jour>).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы «BioEdit v. 7.0.5.3». Последовательности выравнивали с помощью программы множественного выравнивания «ClustalW». Филогенетическое дерево строили по алгоритму NJ в реализации пакета «MEGA v. 7.06».

Результаты

В результате исследований, проведенных в 2018–2022 гг. и охвативших все федеральные округа РФ, специалистами ВНИИЗЖ были выявлены 1082 пробы, содержавшие генетический материал ВГП подтипа Н5 (табл. 1).

ВГП подтипа Н5 на протяжении всего срока исследования выявляли преимущественно в пробах от домашних птиц (табл. 1). Часть вирусов (45) была подвергнута полногеномному секвенированию с целью изучения эволюции вирусов и характеристики их биологических свойств, выборка состав-

лена на основе географического распространения и различий в подтипах вируса по нейраминидазе. Для расширения исследуемой выборки были импортированы доступные в открытых базах данных полногеномные последовательности ВГП подтипа Н5, выявленные на территории России с 2018 по 2022 г. (134 изолята). Необходимо сделать акцент на том, что в отношении ВГП, который в течение одного сезона миграции дикой птицы способен распространяться на огромные территории, использование терминов «популяция», «циркуляция вируса» не является корректным. В данном случае под термином «популяция вируса гриппа птиц» будет пониматься набор из 179 вирусов, выявленных на территории России в 2018–2022 гг., для которых были получены полногеномные последовательности. Термин «популяция ВГП» не подразумевает заявления о наличии на территории России очагов стойкого неблагополучия и длительной циркуляции ВГП.

На основании анализа предсказанной аминокислотной последовательности был определен сайт расщепления вирусного гемагглютинина сравниваемых изолятов. Для всех вирусов он имел сходную структуру, содержащую 6 основных аминокислот с вариацией по позиции 342 — RE(K/R)RRKR. Исключение составил вирус A/dalmatian pelican/Astrakhan/417-1/2021 (H5N5), сайт нарезания которого содержал 7 основных аминокислот RKKRRKR. В рецептор-связывающей части вирусного белка у всех вирусов обнаружен аминокислотный мотив G₂₂₅QRG₂₂₈ (по нумерации подтипа Н3).

Вирусы ВГП подтипа Н5 способны инфицировать млекопитающих, в том числе человека, несмотря на то что их гемагглютинин преимущественно взаимодействует с клеточными рецепторами SAα-2,3-Gal. Однако в случае успешной репродукции ВГП в клетках млекопитающих исследователями были выявлены мутации в других вирусных генах, которые рассматриваются как маркеры адаптации ВГП для размножения в организме млекопитающих. По фенотипическому проявлению маркерные замены можно разделить на две основ-

Таблица 1. Результаты исследования проб на наличие генома ВГП подтипа Н5 на территории России с 2018 по 2022 г.

Год	Количество исследованных проб	Количество проб, содержавших ВГП/Н5	
		от домашних птиц	от диких птиц
2018	2749	208	0
2019	5558	2	0
2020	6288	222	27
2021	6418	297	56
2022	6087	250	20
Сумма	27 100	979	103

² URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

³ URL: <https://www.gisaid.org/>

Таблица 2. Маркерные аминокислотные замены, связанные с адаптацией к размножению ВГП в КК млекопитающих

Белок	Номер позиции аминокислоты и изоляты ВГП, содержащие мутации	Фенотипическое проявление мутации
PB1	622G — все исследованные вирусы	Повышение активности полимеразы [39]
	678S — все исследованные вирусы, за исключением: 678N — A/turkey/Rostov-on-Don/332-XX/2021, 678G — A/dabchick/Tyva/767-58/2021	678N — повышение активности полимеразы [19]
PB2	89V, 309D, 339K, 477G — все исследованные вирусы, 495V/I/A, 676T/I/M/A	Совокупность мутаций: 89V, 309D, 339K, 477G, 495V, 676T — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих [15]
	292I/T, 588A — все исследованные вирусы, за исключением: 292V — H5N8 2018–2020 (кроме кур из Новосибирска в 2020 г.), A/chicken/Kostroma/1761-1 (H5N8), A/chicken/Tomsk/1797-7/20 (H5N8), A/duck/KChR/1590-14/20 (H5N8), A/crow/Khabarovsk/2712-1/2022 (H5N1), A/dabchick/Tyva/767-58/2021 (H5), 588V, A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6)	292V, 588V — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих, повышенная вирулентность для мышей [40]
	389R, 598T — все исследованные вирусы	389R, 598T — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих при низких температурах [41]
	482K — все исследованные вирусы, за исключением: 482R, A/chicken/Kostroma/304-XX/2020 (H5N8), A/chicken/Kostroma/1761-1 (H5N8), A/crow/Khabarovsk/776-56/22 (H5N1), A/duck/Magadan/2272-8/2022 (H5N1), A/goose/Magadan/2272-5/22 (H5N1), A/poultry/Magadan/1560-1/2022 (H5N1)	482R — повышение активности полимеразы в КК млекопитающих [42]
PA	37A, 100V — все исследованные вирусы, за исключением: 37S, A/turkey/Stavropol/165-5/2022	37A, 100V — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих, повышенная вирулентность для мышей [18]
	97T — все исследованные вирусы, за исключением: 97I, A/Chicken/Ryazan/1093-1/2022 (H5N1), A/Poultry/Samara/1659-1/2022 (H5N1), A/Poultry/Samara/1643-1/2022 (H5N1), A/Chicken/Kursk/1281-1/2022 (H5N1), A/Goose/Saratov/1965-1/2022 (H5N1), A/Goose/Belgorod/1498-1/2022 (H5N1), A/Duck/Ivanovo/1462-3/2022 (H5N1), A/Duck/Belgorod/1482-10/2022 (H5N1), A/Chicken/Orel/1484-5/2022 (H5N1), A/Chicken/Kaluga/1424-2/2022 (H5N1), A/Chicken/Rostov/1724-2/2022 (H5N1)	97I — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих, увеличение вирулентности для мышей [43]
	127V, 44V, 241C, 343A, 573I — все исследованные вирусы, за исключением: 127A — все вирусы H5N8/2018	127A, 44I, 241Y, 343T, 573V — повышенная репликация в КК млекопитающих, увеличение вирулентности для мышей [16]
	343A, 347D — все исследованные вирусы, за исключением: 343T — A/Crow/Khabarovsk/2712-1/2022 (H5N1), 343S — вирусы H5N5 и H5N8, циркулировавшие в 2020–2021 гг.	343S, 347E — повышенная репликация в КК млекопитающих, увеличение вирулентности для мышей [44]
	142K, 147I, 171I, 182M — все исследованные вирусы, 142R, A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6), 182L, A/waterfowl/Russia/1526-4/2021 (H5N5), A/shelduck/Kalmykia/1814-1/2021 (H5N5)	142R, 147V, 171V, 182L — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих [45]
NP	224S/A — все исследованные вирусы, 383D — все исследованные вирусы	224P, 383D — повышение активности полимеразы и репликации в КК млекопитающих [17]
	41I — все исследованные вирусы, за исключением: 41V — A/common teal/Chelyabinsk/1379-1/2021 (H5N1)	41V — повышение активности полимеразы в КК млекопитающих при низкой температуре [46]
NS1	3P/S, 41K, 74D — все исследованные вирусы, за исключением: 41R — A/chicken/Tomsk/1797-7/20 (H5N8)	3S, 41K, 74N — усиленная репликация в КК млекопитающих и патогенность для мышей [47]
	55E, 66E, 138F — все исследованные вирусы, за исключением: 66K — вирусы H5N8 2020–2021 138L A/goose/Omsk/3003/2020 (H5N8) A/goose/Omsk/3008/2020 (H5N8)	55E, 66E, 138F — усиленная репликация в КК млекопитающих, снижение реакции на интерферон [48]

ные группы: мутации, связанные с повышением активности вирусного полимеразного комплекса в культуре клеток (КК) млекопитающих; мутации, усиливающие вирулентные свойства вируса при экспериментальном заражении лабораторных мышей и вызывающие изменение метаболизма на уровне организма, связанное с модификацией иммунного ответа в организме хозяина. В анализ были включены аминокислотные замены, для которых экспериментально было показано изменение биологических свойств вируса и установлена связь между мутацией и её фенотипическим проявлением. В **табл. 2** указаны позиции замен аминокислот белков ВГП, способствующие репродукции ВГП в организме млекопитающих.

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности белков полимеразного комплекса выявил единичные маркерные замены, способные усиливать работу репликативного комплекса вируса в клетках млекопитающих, которые закрепились в популяции ВГП. Так, в белке PB1 закрепились лишь 1 замена в положении 622G. Две другие мутации (678N и 105S) имели единичное распространение.

В белке PB2 естественным отбором произошло закрепление мутаций 389R и 598T. Данные мутации среди ВГП регистрировались и ранее, но в настоящее время стали доминирующими. Отмечено широкое распространение в 2018–2020 гг. мутации 292V, появление в популяции единичных мутаций 482R. Анализ набора «адаптационных мутаций» 89V, 309D, 339K, 477G, 495V, 676T свидетельствует о закреплении естественным отбором этого набора аминокислотных замен. Экспериментальные исследования показали, что совокупность данных замен способна компенсировать отсутствие лизина в по-

зиции 627 белка PB2 для успешного размножения ВГП в клетках млекопитающих [15].

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности гена PA показал, что в популяции произошло закрепление мутации 383D. Выявлено широкое распространение мутаций 37A, 61I, 63V, 100V, 343S, 383D и единичные случаи мутаций 224P, 343T, 142R. Несмотря на то что в нуклеотидных последовательностях гена PA обнаружено наибольшее число «адаптационных мутаций», это не представляется критичным, поскольку они случайным образом распределены среди вирусов. Кроме того, ряд выполненных исследований показал необходимость синергического эффекта для фенотипического проявления у млекопитающих «адаптационных мутаций» в гене PA [16–18].

Анализ маркерных аминокислотных замен, связанных с вирулентными свойствами ВГП, показал, что в популяции ВГП закрепились мутация 42S в белке NS1 (**табл. 3**). Данная замена является маркером вирулентных свойств для мышей и способна противодействовать индукции интерферона в клетке-хозяине, а также предотвратить активацию пути NF-κB при иммунном ответе [19]. Кроме этого, у всех изолятов были выявлены аминокислотные замены 30D и 215A в белке M1, признанные детерминантами патогенности для мышей [20].

При изучении факторов патогенности отмечено закрепление в популяции ВГП гена NS1, кодирующего соответствующий белок с дополнительной вставкой из 5 аминокислот в позиции 80–84. Экспериментальные исследования показали, что гибридные вирусы, имеющие данную вставку, могут вызывать в организме гипериммунный ответ — так называемый «цитокиновый шторм» [21]. Проведён-

Таблица 3. Маркерные аминокислотные замены, связанные с повышенной вирулентностью ВГП

Белок	Номер позиции аминокислоты и изоляты ВГП, содержащие мутации	Фенотипическое проявление мутации
PB1	105S — A/chicken/Penza/300/2018	Увеличение вирулентности у мышей [43]
PB1-F2	66N — все исследованные вирусы, за исключением: 66S — изоляты ВГП 2019–2022 подтипов H5N5, H5N1 319N — все исследованные вирусы, за исключением: 319K	66S — вирулентность и усиление иммунного ответа для мышей [34, 54]
NP	A/Crow/Khabarovsk/776-56/22 (H5N1) A/Duck/Magadan/2272-8/2022 (H5N1) A/Goose/Magadan/2272-5/22 (H5N1) A/Poultry/Magadan/1560-1/2022 (H5N1) A/Chicken/Ryazan/1093-1/2022 (H5N1)	319K — нарушение внутриядерного транспорта в клетках млекопитающих [23]
M1	30D, 215A — все исследованные вирусы 43M — все исследованные вирусы	30D, 215A — увеличение вирулентности у мышей Увеличение вирулентности у мышей [49]
NS1	42S — все исследованные вирусы 92D — все исследованные вирусы, за исключением: 92E, A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) 103F/Y, 106M — все исследованные вирусы	Повышенная вирулентность и снижение противовирусного ответа для мышей [50] 92D — повышенная вирулентность для свиней и мышей [51] 103F, 106M — повышенная вирулентность для мышей [52, 53]

ный анализ показал, что среди вирусов гриппа данная мутация стала закрепляться после 2017 г.

Обсуждение

В результате проведенной работы установлено закрепление эволюционным отбором ряда аминокислотных замен, способствующих успешному размножению ВГП в организме млекопитающих. При этом остаются вопросы о механизме функционирования вирусного рецептора, который позволяет вирусу осуществлять межвидовой переход. Согласно ранее проведенным исследованиям, аминокислотный мотив G₂₂₅QRG₂₂₈ характерен для вирусов гриппа, выделенных от птиц, и обладает высокой аффинностью к рецепторам группы SA α -2,3-Gal [14, 22]. Однако интерпретация аффинных свойств вирусного гемагглютинина к рецепторам группы SA α -2,3-Gal или к рецепторам группы SA α -2,6-Gal по первичной аминокислотной последовательности затруднительна. Установлено, что изменение тропных свойств вирусов гриппа возможно в результате возникновения как единичных мутаций, так и целого набора мутаций в аминокислотной последовательности. В наших неопубликованных исследованиях и данных литературы по сравнительному анализу предсказанной аминокислотной последовательности гена *HA* вирусов, выделенных от птиц и млекопитающих, не выявлено аминокислотных замен, которые были бы характерны только для ВГП или только для вирусов, выделенных от млекопитающих. По всей видимости, гемагглютинин вируса гриппа генетической клады 2.3.4.4 в результате единичных мутаций способен менять свои аффинные свойства в отношении остатков сиаловых кислот и, сохраняя функциональность, может преодолевать межвидовой барьер, сочетаясь с различными типами вирусной нейраминидазы.

У ВГП, выделенных в промышленном хозяйстве в Ростовской области, — A/turkey/Rostov-on-Don/332-XX/2021 в белке PB1 обнаружена мутация 678N; на территории Республики Тыва выявлен вирус A/dabchick/Tyva/767-58/2021 с мутацией 678G. Согласно экспериментальным данным, сочетание аминокислот 13P и 678N вызывает резкое увеличение полимеразной активности ВГП при размножении в клетках млекопитающих [19]. У изолята A/chicken/Penza/300/2018 выявлена мутация 105S, усиливающая проявление вирулентных свойств в отношении мышей. Для проверки происхождения данных мутаций был выполнен филогенетический анализ, который показал, что вирусы A/turkey/Rostov-on-Don/332-08/2021, A/dabchick/Tyva/767-58/2021 и A/chicken/Penza/300/2018 находятся в группах, включающих вирусы, распространившиеся на территории России в период с 2018 по 2022 г. и не имевшие подобных мутаций (рисунк). Филогенетический анализ подтверждает, что появление мутаций 105S,

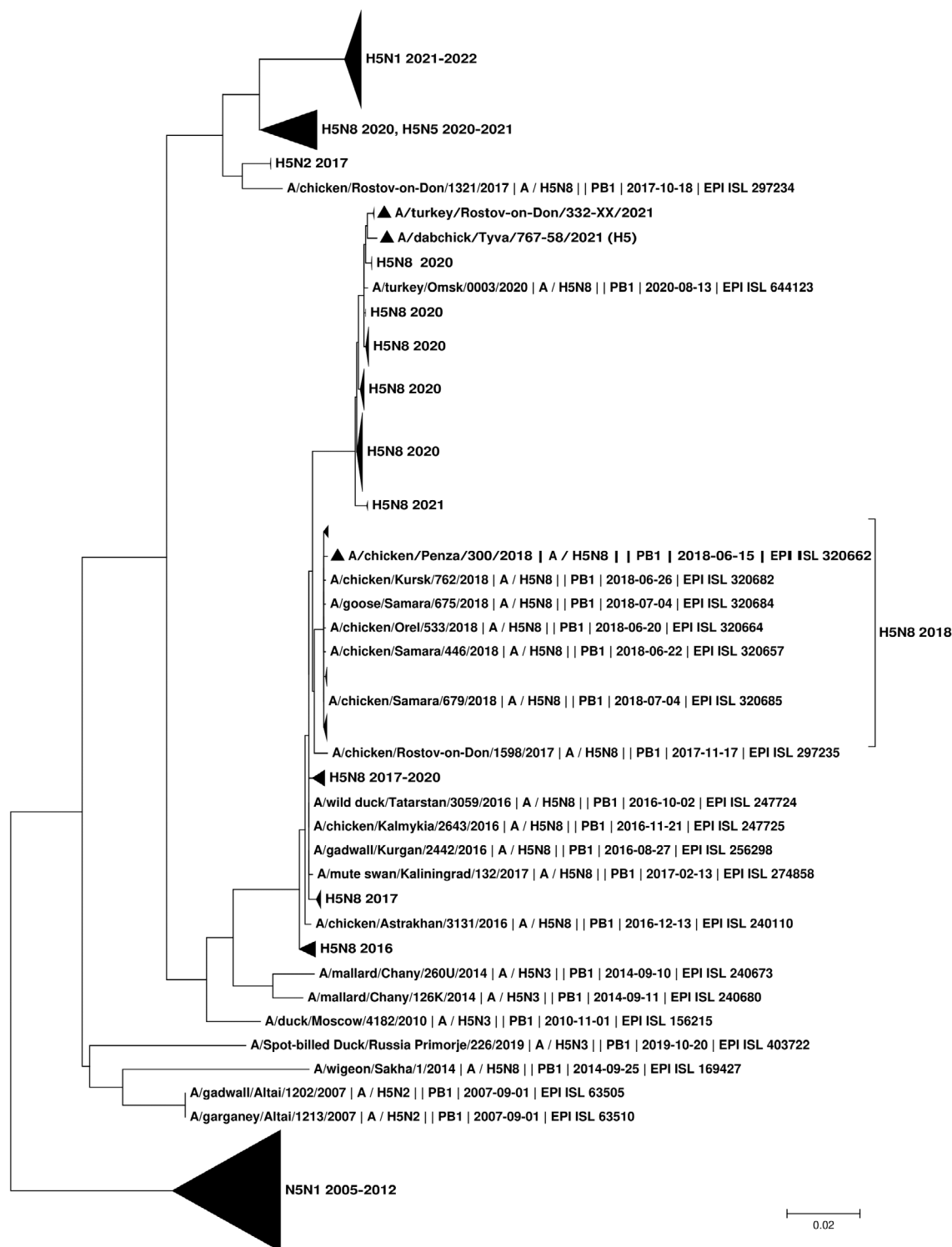
678N, 678G в белке PB1 среди ВГП, выявленных на территории России, является результатом антигенного дрейфа, а не антигенного шифта.

Анализ возникновения замен в репликативных белках ВГП (на примере мутаций 678N и 105S белка PB1) показал, что возникновение единичных мутаций в результате антигенного дрейфа происходит крайне редко даже в условиях частых эпизоотий. Единичное и незначительное распространение в популяции ВГП мутаций, способствующих развитию болезни у млекопитающих в случае межвидового перехода, демонстрирует целесообразность и эффективность стратегии стемпинг-аут в борьбе с гриппом птиц как болезни с зооантропонозным потенциалом. Применение стратегии стемпинг-аут, подразумевающей тотальное уничтожение всех инфицированных животных, рекомендовано Всемирной организацией здоровья животных для ряда эмерджентных болезней, обладающих панзоотическим потенциалом и способных сохраняться в популяциях диких животных. При надлежащем надзоре за поголовьем сельскохозяйственной птицы с использованием методов молекулярной биологии можно своевременно выявлять ВГП и проводить ликвидацию очага, не допуская возможности межвидового перехода к млекопитающим. Эффективность стратегии стемпинг-аут подтверждает исчезновение из вирусной популяции таких мутаций, как 127A в белке PA и 292V в белке PB2. Эти мутации были выявлены у вирусов в период эпизоотии ВГП подтипа H5N8 2018 г. Мутация 292V в белке PB2 в единичных случаях была зарегистрирована и после 2018 г., однако своевременное уничтожение инфицированного поголовья не позволило ВГП проникнуть в популяцию млекопитающих. Из популяции ВГП эти мутации были отсеяны естественным отбором, поскольку имели негативный эффект для размножения вируса в организме птиц. По всей видимости, в популяциях ВГП существует динамическое равновесие, поддерживаемое естественным отбором, благодаря чему адаптационные мутации к млекопитающим исчезают из популяции. Это можно наблюдать на примере разброса подобных мутаций по различным генам среди ВГП — они встречаются у различных вирусов с разной частотой, но не было обнаружено вирусов, которые бы содержали в своем геноме полный спектр адаптационных мутаций к млекопитающим. Кроме этого, у изученных нами вирусов выявлены новые замены в позициях, изменения в которых влияют на репликацию в клетках млекопитающих (табл. 3).

Влияние новых мутаций на репликацию и вирулентные свойства ВГП в отношении млекопитающих экспериментально не изучено. Несмотря на отсутствие экспериментальных данных, указывающих на усиление репликации вируса от новых замен, это внушает опасение, поскольку ранние работы по

эволюции ВГП показали, что, преодолевая видовой барьер, он проходит фазу, позволяющую постепенно приобретать адаптивные мутации, не теряя приспособленности к старому хозяину [23, 24]. Ранее проведённые исследования по изучению трансмиссивности ВГП, выполненные другими ис-

следователями, указывают на сложный и зачастую комплексный характер изменений в геноме ВГП при межвидовом переходе и закреплении вируса в популяции нового вида [25–28]. Исследования, выполненные в НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, также показали возмож-



Филогенетическое дерево, построенное методом NJ на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена *PB1* (1–2275 п.н. ОРС) ВГП подтипа H5. Треугольниками отмечены ВГП с адаптационными мутациями.

ность адаптации и приобретения ВГП патогенных свойств для лабораторных мышей в течение 7–10 циклов экспериментального заражения [29].

В нашем анализе, кроме единичных замен, отмечено, что в популяции ВГП после 2020 г. на территории России закрепились вирусы, способные транслировать полноразмерный белок PB1-F2. Трансляция стала возможна благодаря нуклеотидной мутации *A129C* (нумерация от начала открытой рамки считывания гена *PB1*), ликвидировавшей стоп-кодон. Ген *PB1-F2* находится внутри рамки считывания гена *PB1* и кодирует белок, влияющий на тяжесть воспалительного процесса. В настоящее время однозначного описания влияния данного белка на вирулентные свойства вируса нет. Достоверно известно, что фенотипическое проявление одной и той же формы гена *PB1-F2* различается у птиц и млекопитающих. Уже было показано, что экспрессия *PB1-F2* снижает вирулентность для птиц [30–32]. По результатам экспериментального заражения установлено, что в то время как при заражении птиц не было замечено усиления вирулентности, заражение мышей выявило явное участие белка PB1-F2 вируса H7N1 в воспалительной реакции организма хозяина, как ранее было показано для штаммов ВГП подтипов H1N1 и H5N1 [32]. Результаты экспериментального заражения у хорьков при заражении ВГП с экспрессией PB1-F2 отличались от течения инфекционного процесса при использовании вируса без экспрессии PB1-F2. Заражение вирусом, экспрессирующим PB1-F2, коррелировало со значительным нарушением регуляции числа лейкоцитов на 3-й и 7-й дни после заражения; экспрессия PB1-F2 была связана как с лимфопенией, так и с повышенным количеством нейтрофилов. Лимфопения у всех хорьков была проходящей, и уровни лейкоцитов возвращались к исходному значению на 19-й день после заражения [33]. Все вирусы с активной формой гена *PB1-F2* имеют аминокислотную мутацию *66S*. В ряде исследований показано, что вирусы с данной мутацией вызывали более тяжёлый инфекционный процесс среди инфицированных лабораторных мышей [34]. Данная мутация была у ВГП, выделенных от норок в Испании в 2022 г. [5]. Кроме этого, данная мутация была одной из тех, что отличали смертоносный вирус A/Brevig Mission/18, так называемый «испанский грипп», полыхавший в начале XX столетия по всему миру [34]. Помимо непосредственного воздействия белка PB1-F2 на протекание инфекционного процесса, получены данные, которые указывают на возможность более тяжёлого инфекционного процесса при взаимной экспрессии полноразмерных белков PB1-F2 и PA-X [35]. Проведённый анализ показал, что все исследованные в данной работе ВГП способны экспрессировать полноразмерный белок PA-X.

Отдельно стоит обратить внимание на вариабельность С-концевой последовательности белка NS1. Ранее проведённые работы показали, что единичные замены в 4 последних аминокислотах влияют на возможность эффективного межвидового перехода от свиней к мышам, сопровождающегося проявлением патогенных свойств в отношении нового хозяина [36]. Так, ВГП подтипа H1N1, имевшие в своем составе белок NS1, где последние 4 аминокислоты были PEQK и RSEV, не могли инфицировать мышей, тогда как тот же вирус, чей белок NS1 заканчивался аминокислотным мотивом GSEI и EPEV, успешно индуцировал инфекционный процесс у мышей, достигая титра 2300 БОЕ/г [37]. Среди ВГП, выявленных на территории России за 2018–2022 гг., концевой мотив белка NS1 имел вариации GSEV, LPPK, FPPK, ESEV, ESEI. Подобное разнообразие концевых мотивов белка NS1 может обеспечивать широкое распространение ВГП среди различных видов птиц [38].

Полученные в результате анализа наличия маркерных замен у ВГП/H5 данные указывают на активный эволюционный процесс, происходящий в настоящее время в популяции ВГП. Наличие в популяции ВГП факторов патогенности для млекопитающих может способствовать успешному межвидовому переходу вируса за счёт подавления отдельных элементов иммунной защиты. После межвидового перехода вирус может оказаться в русле «накопительной» изменчивости, когда в процессе естественного отбора закрепляются единичные мутации, усиливающие фенотипическое проявление или функциональные свойства отдельных белков и предоставляющие конкурентные преимущества относительно других вирусов.

Подобный сценарий межвидового перехода подчёркивает необходимость использования стратегии стемпинг-аут и запрета на вакцинацию против ВППП в промышленном птицеводстве в качестве сдерживающего фактора для ВГП как возбудителя зооантропонозного заболевания. Своевременное и полное уничтожение инфицированного поголовья птицы позволяет избежать межвидового перехода ВГП к млекопитающим через бродячих собак, кошек или мелких грызунов. В случае бесконтрольной вакцинации против ВППП может происходить скрытая циркуляция ВГП среди восприимчивого поголовья без проявления клинических признаков, результатом которой будет увеличение генетического разнообразия популяции ВГП и активное появление новых мутаций, в числе которых могут оказаться и «полезные» для вируса, способствующие межвидовому переходу.

Заключение

В результате проведённых исследований установлено, что среди ВГП подтипа H5, выявлен-

ных на территории России в 2018–2022 гг., преобладали вирусы с ферментативным комплексом, адаптированным к репликации в клетках птиц. Адаптационные мутации к репликации в клетках млекопитающих единичны и хаотично распределены в популяции вируса. Вирусный гемагглютинин обладает аффинностью преимущественно к клеточным рецепторам птиц. Показано появление и распространение в популяции ВГП факторов вирулентности для млекопитающих. Наличие таких факторов может способствовать успешному межвидовому переходу вируса с последующей адаптацией вирусного гемагглютинина к клеточным рецепторам млекопитающих в результате антигенного дрейфа и закрепления новых мутаций в ходе естественного отбора.

Полученные результаты указывают на эффективность стратегии стемпинг-аут и запрета на вакцинацию против ВППП в промышленном птицеводстве в качестве сдерживающего фактора для ВГП как возбудителя зооантропонозного заболевания. Своевременное и полное уничтожение поголовья птицы, инфицированной ВППП, способным в процессе размножения продуцировать факторы патогенности для млекопитающих и обладающим отдельными адаптационными мутациями в репликативных белках, позволяет избежать или значительно снизить вероятность межвидового перехода ВГП от птиц к млекопитающим через бродячих животных или мелких грызунов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ|REFERENCES

1. Марченко В.Ю., Гончарова Н.И., Тран Т.Н. и др. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):31–7. Marchenko V.Yu., Goncharova N.I., Tran T.N., et al. Overview of the epizootiological situation on highly pathogenic avian influenza virus in Russia in 2019. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):31–7. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-31-37> EDN: <https://elibrary.ru/rnioio>
2. Lewis N.S., Banyard A.C., Whittard E., et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg. Microbes Infect.* 2021;10(1):148–51. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1872355>
3. Виткова О.Н., Караулов А.К., Ирза В.Н. и др. Эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц и болезни Ньюкасла в Российской Федерации в 2016–2020 годах. *Эффективное животноводство*. 2021;(4):76–8. Vitkova O.N., Karaulov A.K., Irza V.N., et al. Epizootic situation of highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease in the Russian Federation in 2016–2020. *Efficient Animal Husbandry*. 2021;(4):76–8. EDN: <https://elibrary.ru/utlbye>
4. Ирза В.Н., Волков М.С., Варкентин А.В. О текущей панзоотии высокопатогенного гриппа птиц. *Эффективное животноводство*. 2022;(5):85–6. Irza V.N., Volkov M.S., Varkentin A.V. About the current epizootic of highly pathogenic avian influenza. *Efficient Animal Husbandry*. 2022;(5):85–6. EDN: <https://elibrary.ru/rcsitl>
5. Agüero M., Monne I., Sanchez A., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Euro Surveill*. 2023;28(3):2300001. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.3.2300001>
6. Honglei S., Fangtao L., Qingzhi L., et al. Mink is a highly susceptible host species to circulating human and avian influenza viruses. *Emerg. Microbes Infect.* 2021;10(1):472–80. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1899058>
7. Bordes L., Vreman S., Heutink R., et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) show neurotropism and adaptive virus mutations. *Microbiol. Spectr.* 2023;11(1):e0286722. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02867-22>
8. Floyd T., Banyard A.C., Lean F.Z., et al. Encephalitis and death in wild mammals at a rehabilitation center after infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2021;27(11):2856–63. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2711.211225>
9. Postel A., King J., Kaiser F.K., et al. Infections with highly pathogenic avian influenza A virus (HPAIV) H5N8 in harbor seals at the German North Sea coast. *Emerg. Microbes Infect.* 2022;11(1):725–9. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2043726>
10. Rodriguez Z., Picasso-Risso C., O'Connor A., Ruegg P.L. Hot topic: epidemiological and clinical aspects of highly pathogenic avian influenza H5N1 in dairy cattle. *JDS Commun.* 2024;5(Suppl. 1):S8–12. DOI: <https://doi.org/10.3168/jdsc.2024-0650>
11. Butt S.L., Nooruzzaman M., Covalada L.M., Diel D.G. Hot topic: influenza A H5N1 virus exhibits a broad host range, including dairy cows. *JDS Commun.* 2024;5(Suppl. 1):S13–9. DOI: <https://doi.org/10.3168/jdsc.2024-0638>
12. Burroughs E.R., Magstadt D.R., Petersen B., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) clade 2.3.4.4b virus infection in domestic dairy cattle and cats, united states, 2024. *Emerg. Infect. Dis.* 2024;30(7):1335–43. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid3007.240508>
13. Uyeki T.M., Milton S., Abdul Hamid C., et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in a dairy farm worker. *N. Engl. J. Med.* 2024;390(21):2028–9. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2405371>
14. Gabriel G., Abram M., Keiner B., et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 2006;312(5772):404–10. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1124513>
15. Li J., Ishaq M., Prudence M., et al. Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2. *Virus Res.* 2009;144(1–2):123–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.04.008>
16. Yamaji R., Yamada S., Le M.Q., et al. Mammalian adaptive mutations of the PA protein of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus. *J. Virol.* 2015;89(8):4117–25. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03532-14>
17. Song J., Xu J., Shi J., et al. Synergistic effect of S224P and N383D substitutions in the PA of H5N1 avian influenza virus contributes to mammalian adaptation. *Sci. Rep.* 2015;5:10510. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep10510>
18. Hu M., Yuan S., Ye Z.W., et al. PA_N substitutions A37S, A37S/I61T and A37S/V63I attenuate the replication of H7N7 influenza A virus by impairing the polymerase and endonuclease activities. *J. Gen. Virol.* 2017;98(3):364–73. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000717>
19. Gabriel G., Dauber B., Wolff T., et al. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005;102(51):18590–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0507415102>

20. Fan S., Deng G., Song J., et al. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology*. 2009;384(1):28–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.044>
21. Chen S., Miao X., Huangfu D., et al. H5N1 avian influenza virus without 80–84 amino acid deletion at the NS1 protein hijacks the innate immune system of dendritic cells for an enhanced mammalian pathogenicity. *Transbound. Emerg. Dis.* 2021;68(4):2401–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13904>
22. Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Teneberg S., et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*. 1997;233(1):224–34. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8580>
23. Gabriel G., Herwig A., Klenk H.D. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin α is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040011>
24. Gabriel G., Abram M., Keiner B., et al. Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *J. Virol.* 2007;81(17):9601–4. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00666-07>
25. Imai M., Watanabe T., Hatta M., et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*. 2012;486(7403):420–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10831>
26. Russell C.A., Fonville J.M., Brown A.E., et al. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science*. 2012;336(6088):1541–7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1222526>
27. Herfst S., Schrauwen E.J., Linster M., et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*. 2012;336(6088):1534–41. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1213362>
28. Herfst S., Imai M., Kawaoka Y., Fouchier R.A.M. Avian influenza virus transmission to mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014;385:137–55. DOI: https://doi.org/10.1007/82_2014_387
29. Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Lomakina N.F., et al. Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals. *Microbiol. Indep. Res. J.* 2021;8(1):80–91. DOI: <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61>
30. Leymarie O., Embury-Hyatt C., Chevalier C., et al. PB1-F2 attenuates virulence of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus in chickens. *PLoS One*. 2014;9(6):e100679. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100679>
31. James J., Howard W., Iqbal M., et al. Influenza A virus PB1-F2 protein prolongs viral shedding in chickens lengthening the transmission window. *J. Gen. Virol.* 2016;97(10):2516–27. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000584>
32. Mettler J., Marc D., Sedano L., et al. Study of the host specificity of PB1-F2-associated virulence. *Virulence*. 2021;12(1):1647–60. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1933848>
33. Hai R., Schmolke M., Varga Z.T., et al. PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J. Virol.* 2010;84(9):4442–50. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02717-09>
34. Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., et al. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog.* 2007;3(10):1414–21. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030141>
35. Ma J., Li S., Li K., et al. Effects of the PA-X and PB1-F2 proteins on the virulence of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus in mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:315. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00315>
36. Lloren K.K.S., Lee T., Kwon J.J., Song M.S. Molecular markers for interspecies transmission of avian influenza viruses in mammalian hosts. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(12):2706. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18122706>
37. Wang J., Qi X., Lu C. Mutations in the C-terminal tail of NS1 protein facilitate the replication of classical swine H1N1 influenza A virus in mice. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2012;57(3):169–75. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0110-0>
38. Soubies S.M., Volmer C., Croville G., et al. Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. *J. Virol.* 2010;84(13):6733–47. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02427-09>
39. Feng X., Wang Z., Shi J., et al. Glycine at position 622 in PB1 contributes to the virulence of H5N1 avian influenza virus in mice. *J. Virol.* 2015;90(4):1872–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02387-15>
40. Xiao C., Ma W., Sun N., et al. PB2-588V promotes the mammalian adaptation of H10N8, H7N9 and H9N2 avian influenza viruses. *Sci. Rep.* 2016;6:19474. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep19474>
41. Hu M., Yuan S., Zhang K., et al. PB2 substitutions V598T/I increase the virulence of H7N9 influenza A virus in mammals. *Virology*. 2017;501:92–101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.008>
42. Yamayoshi S., Kiso M., Yasuhara A., et al. Enhanced replication of highly pathogenic influenza A (H7N9) virus in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2018;24(4):746–50. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2404.171509>
43. Taft A.S., Ozawa M., Fitch A., et al. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. *Nat. Commun.* 2015;6:7491. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms8491>
44. Zhong G., Le M.Q., Lopes T.J.S., et al. Mutations in the PA protein of avian H5N1 influenza viruses affect polymerase activity and mouse virulence. *J. Virol.* 2018;92(4):e01557-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01557-17>
45. Liang L., Jiang L., Li J., et al. Low polymerase activity attributed to PA drives the acquisition of the PB2 E627K mutation of H7N9 avian influenza virus in mammals. *mBio*. 2019;10(3):e01162-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01162-19>
46. Zhu W., Zou X., Zhou J., et al. Residues 41 V and/or 210D in the NP protein enhance polymerase activities and potential replication of novel influenza (H7N9) viruses at low temperature. *Virol. J.* 2015;12:71. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0304-6>
47. Kanrai P., Mostafa A., Madhugiri R., et al. Identification of specific residues in avian influenza A virus NS1 that enhance viral replication and pathogenicity in mammalian systems. *J. Gen. Virol.* 2016;97(9):2135–48. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000542>
48. Li J., Zhang K., Chen Q., et al. Three amino acid substitutions in the NS1 protein change the virus replication of H5N1 influenza virus in human cells. *Virology*. 2018;519:64–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.04.004>
49. Nao N., Kajihara M., Manzoor R., et al. A single amino acid in the M1 protein responsible for the different pathogenic potentials of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137989. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137989>
50. Jiao P., Tian G., Li Y., et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J. Virol.* 2008;82(3):1146–54. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01698-07>
51. Lipatov A.S., Andreansky S., Webby R.J., et al. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J. Gen. Virol.* 2005;86(Pt. 4):1121–30. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80663-0>

52. Ayllon J., Domingues P., Rajsbaum R., et al. A single amino acid substitution in the novel H7N9 influenza A virus NS1 protein increases CPSF30 binding and virulence. *J. Virol.* 2014;88(20):12146–51.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01567-14>
53. Spesock A., Malur M., Hossain M.J., et al. The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins. *J. Virol.* 2011;85(14):7048–58.
DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00417-11>

Информация об авторах

Зиняков Николай Геннадьевич — канд. биол. наук, в. н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, zinyakov@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Грехнева Елена Дмитриевна[✉] — аспирант, ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, grehneva@arriah.ru, <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>

Андриясов Артём Валерьевич — канд. биол. наук, в. н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, andriyasov_av@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>

Овчинникова Евгения Валерьевна — канд. биол. наук, с. н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, ovchinnikova@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>

Гусева Нелли Андреевна — ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, guseva_na@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7623-4749>

Козлов Антон Александрович — канд. биол. наук, н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, kozlov_aa@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>

Никонова Зоя Борисовна — канд. биол. наук, н. с. референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, nikonova@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>

Жестков Павел Дмитриевич — ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, zhestkov@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>

Андрейчук Дмитрий Борисович — канд. биол. наук, зав. референтной лабораторией вирусных болезней птиц Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, andreychuk@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>

Чвала Илья Александрович — канд. вет. наук, зам. директора по научно-исследовательской работе Федерального центра охраны здоровья животных, Владимир, Россия, chvala@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

Участие авторов: Зиняков Н.Г. — составление плана научной работы и проведение полногеномного секвенирования; Андриясов А.В., Овчинникова Е.В., Гусева Н.А. — исследование биологического материала на наличие вируса гриппа птиц; Никонова З.Б., Жестков П.Д. — вирусыведение положительных проб; Грехнева А.Д., Козлов А.А. — подготовка нуклеиновой кислоты для полногеномного секвенирования; Андрейчук Д.Б., Чвала И.А. — составление плана научной работы и организация отбора и доставки материала для исследования. Все авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем. 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 06.02.2025;
принята к публикации 24.04.2025;
опубликована 28.06.2025

Information about the authors

Nikolay G. Zinyakov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, zinyakov@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Alena D. Grekhneva[✉] — leading specialist, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, grehneva@arriah.ru, <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>

Artem V. Andriyasov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, andriyasov_av@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>

Evgeniya V. Ovchinnikova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, ovchinnikova@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>

Nelli A. Guseva — leading specialist, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, guseva_na@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7623-4749>

Anton A. Kozlov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, kozlov_aa@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>

Zoya B. Nikonova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, nikonova@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>

Pavel D. Zhestkov — leading specialist, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, zhestkov@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>

Dmitry B. Andreychuk — Cand. Sci. (Biol.), Head, Reference laboratory for avian viral diseases, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, andreychuk@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>

Ilya A. Chvala — Cand. Sci. (Vet.), Deputy director for research, Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russia, chvala@arriah.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

Author contribution: Zinyakov N.G. — drawing up a plan for scientific work and conducting full-genome sequencing; Andriyasov A.V., Ovchinnikova E.V., Guseva N.A. — examination of biological material for the presence of avian influenza virus; Nikonova Z.B., Zhestkov P.D. — virus isolation of positive samples; Grekhneva A.D., Kozlov A.A. — preparation of nucleic acid for whole genome sequencing; Andreychuk D.B., Chvala I.A. — development of the plan of scientific work and organization of selection and delivery of material for the study. 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 06.02.2025;
accepted for publication 24.04.2025;
published 28.06.2025

НАУКА И ПРАКТИКА

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-673>



Усовершенствование бактериологического метода при выделении *Listeria monocytogenes*

Храмов М.В., Домотенко Л.В., Полосенко О.В.✉, Мицевич И.П.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия

Аннотация

Введение. Листериоз расценивается как одна из опасных вакцинонеуправляемых инфекций, характеризующаяся тяжестью клинического процесса и высокой летальностью. Актуальным направлением остаётся совершенствование методов лабораторной диагностики, особенно при листериозном менингите, для выявления возбудителя в оптимально сжатые сроки.

Цель исследования — изучить поведение музейных и клинических штаммов различных видов листерий на ГБМ-агаре — питательной среде для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов — для усовершенствования бактериологического метода при выделении и идентификации *Listeria monocytogenes*.

Материалы и методы. В работе использованы 1125 образцов клинического материала и пищевых продуктов, 95 выделенных и 5 референтных штаммов *Listeria* spp., питательные среды для выделения листерий: агар *Listeria* по Оттавиани и Агости (ALOA); питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ), питательный агар для выделения листерий (ПАЛ), ГБМ-агар.

Результаты. Из 1125 образцов, поступивших на исследование, с использованием ПБЛ, ПАЛ и ALOA выделены штаммы: *L. monocytogenes* — 89, *L. welshimeri* — 2, *L. innocua* — 3, *L. seeligeri* — 1. Все изоляты и тест-штаммы субкультивировали на традиционные селективные среды (ПАЛ, ALOA) и дополнительно на ГБМ-агар, модифицированный внесением селективной добавки для выделения *L. monocytogenes* и желточной эмульсии. На модифицированном ГБМ-агаре выросшие колонии, относящиеся к роду *Listeria*, были крупнее и имели отличительные морфологические признаки от колоний, полученных на классических листериозных средах, что позволило провести первичную дифференциацию *L. monocytogenes* от непатогенных видов листерий и других возбудителей гнойных бактериальных менингитов.

Заключение. Показана возможность использования в алгоритме культурального метода новой питательной среды (модифицированный ГБМ-агар), обладающей улучшенными ростовыми свойствами в отношении *L. monocytogenes*, внедрение которой послужит дополнительным эффективным средством для дифференциации листерий при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии.

Ключевые слова: листериоз, *Listeria monocytogenes*, питательные среды, модифицированный ГБМ-агар, пищевая инфекция

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (протокол № ВП-2025/3 от 17.05.2025).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

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

Для цитирования: Храмов М.В., Домотенко Л.В., Полосенко О.В., Мицевич И.П. Усовершенствование бактериологического метода при выделении *Listeria monocytogenes*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(3):362–369.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-673>

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

Improvement of the bacteriological method for isolation of *Listeria monocytogenes*

Mikhail V. Khramov, Lyubov V. Domotenko, Olga V. Polosenko[✉], Irina P. Mitsevich

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Abstract

Introduction. Currently, listeriosis is regarded as one of the dangerous infections that cannot be prevented by vaccination and is characterized by the severity of the clinical process and high mortality. Improving laboratory diagnostic methods especially in listeriosis meningitis to identify the pathogen in the shortest possible time remains an urgent problem.

The aim of the study was to investigate the behavior of collection and clinical strains of various listeria species on GBM-agar — a nutrient medium for isolating pathogens of purulent bacterial meningitis — in order to improve the bacteriological method for isolating and identifying *Listeria monocytogenes*.

Materials and methods. In the current study, 1125 samples of clinical material and food produces were used. Of these, 95 were isolated and 5 were reference strains of *Listeria* spp. The following culture media to isolate listeria were used: Agar *Listeria* by Ottaviani and Agosti (ALOA); *Listeria* enrichment broth (LEB), *Listeria* isolation agar (LIA), GBM-agar.

Results. Of the 1125 samples involved the following strains were isolated using LEB, LIA and ALOA media: *L. monocytogenes* — 89, *L. welshimeri* — 2, *L. innocua* — 3, *L. seeligeri* — 1. All isolates and reference strains were subcultured by using conventional selective media (LIA, ALOA) and additionally GBM-agar modified by adding a selective additive to isolate *L. monocytogenes*, and yolk emulsion. Colonies grown on the modified GBM-agar and belonging to the *Listeria* genus were larger and had distinctive morphological traits making them differ from colonies obtained by means of conventional listeriosis media. This allowed for the primary differentiation of *L. monocytogenes* from non-pathogenic listeria species and some other pathogens of purulent bacterial meningitis.

Conclusion. It is shown that the algorithm of the culture method can use a new nutrient medium (modified GBM agar) possessing improved growth properties for *L. monocytogenes*, the introduction of which will serve as an additional effective means for differentiating listeria during research in sanitary and clinical microbiology.

Keywords: *listeria*, *Listeria monocytogenes*, *nutrient media*, *modified GBM-agar*, *food-borne infection*

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 State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (protocol No. ВП-2025/3, May 17, 2025).

Funding source. The research was carried out within the framework of the industry program of Rospotrebnadzor.

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

For citation: Khramov M.V., Domotenko L.V., Polosenko O.V., Mitsevich I.P. Improvement of the bacteriological method for isolation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3): 362–369.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-673>

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

Введение

Листериоз является не только медико-социальной, но и экономической проблемой. Несмотря на то что в последние годы заболеваемость листериозом держится на уровне спорадических случаев, листериоз расценивается как одна из опасных вакцинонеуправляемых инфекций, характеризуется тяжестью клинического процесса и высокой летальностью (до 20%) [1, 2].

Заболеваемость листериозом обусловлена контаминацией и активным размножением листерий в продуктах питания, повышением восприимчивости к листериям у групп риска на фоне нарушений

клеточного иммунитета [1, 3]. В последние годы получены данные о циркуляции листерий в растительных, почвенных, водных субстратах, их высоких адаптивных возможностях в широком температурном диапазоне, влажности и pH среды. Имеются данные о контаминации возбудителем листериоза водных источников вблизи животноводческих предприятий [4].

У здоровых людей инфицирование обычно протекает бессимптомно или в виде гастроэнтерита [1, 2, 5]. У пожилых людей с ослабленным иммунитетом, беременных женщин и новорождённых или у пациентов, получающих иммуносупрессив-

ную терапию, листериоз может проявляться в виде бактериемии или сепсиса, поражения центральной нервной системы и т. д., приводя к серьёзным или потенциально смертельным заболеваниям, включая сепсис или менингит [2, 6, 7–12].

Клинические проявления этих форм заболевания, включая листериозный менингит, неспецифичны, в основном это повышение температуры, головная боль, рвота и расстройства сознания, что аналогично другим типам гнойного менингита [2, 3, 6, 7].

Листериоз вызывают грамположительные, факультативно анаэробные, энтероинвазивные бактерии рода *Listeria*. Основным возбудителем заболеваний человека является *L. monocytogenes*, который способен вызвать листериоз и у животных [1]. Основным возбудителем листериоза у животных — *L. ivanovii*, который в редких случаях может привести к заболеванию у людей [19]. Известны единичные случаи листериоза, вызванные *L. innopcia* и *L. seeligeri* [20, 21].

При лабораторной диагностике листериозов и санитарно-бактериологических исследованиях ведущую роль занимает бактериологический метод с использованием питательных сред [13].

Выделение листерий из нестерильного клинического материала и пищевых продуктов удаётся лишь с помощью селективных питательных сред или процедуры обогащения. В качестве селективных сред обогащения используют питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ), бульон Фрейзера, бульон UVM, в качестве селективных дифференциально-диагностических сред: питательный агар для выделения листерий (ПАЛ), агар *Listeria* по Оттавиани и Агости (ALOA), Бриллианс *Listeria* агар, Оксфорд агар, Палкам агар и др.

Среды ПАЛ, Палкам агар не обеспечивают видовую дифференциацию листерий. На таких средах выделение листерий основано на их способности гидролизовать эскулин с образованием эскулетина, который в присутствии ионов железа образует чёрный комплекс; в результате листерии всех видов формируют колонии сероватого цвета с чёрной зоной вокруг.

Хромогенные среды (ALOA и Бриллианс *Listeria* агар) со специальной селективной и хромогенной добавками позволяют выделять листерии разных видов в виде колоний сине-зелёного цвета и дифференцировать *L. monocytogenes* и некоторые штаммы *L. ivanovii* от других видов *Listeria* по образованию характерного ореола вокруг колоний за счёт способности продуцировать фосфолипазу С.

Селективность сред по отношению к сопутствующей микрофлоре обеспечивается включением в их состав хлорида лития, акрифлавина, циклогексимида, налидиксиновой кислоты, полимиксина и других антибиотиков [14].

Для выделения листерий из стерильных в норме биологических субстратов (кровь, спинномозговая жидкость и др.), что характерно при бактериологическом исследовании менингита, могут быть использованы кровяной и шоколадный агары, а также ГБМ-агар — питательная среда для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов без селективных добавок [15]. Листерии на этих средах через 24–48 ч культивирования вырастают в виде круглых выпуклых полупрозрачных непигментированных колоний с гладкой поверхностью.

Богатая основа ГБМ-агара, содержащая гидролизат казеина, пептон, дрожжевой экстракт, стимулятор роста гемофильных микроорганизмов, глюкозу, способна поддерживать рост листерий различных видов.

Поскольку основное назначение ГБМ-агара связано с культивированием и выделением трех основных возбудителей бактериальных менингитов: *Haemophilus influenzae* type B, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, в его состав входят селективные добавки только для них. Селективные добавки для листерий имеют иной состав антибиотиков и содержат краситель акрифлавин, обладающий антисептическими свойствами и способный придавать колониям *L. monocytogenes* зелёный цвет.

Предварительные исследования клинического материала от больных менингитом показали, что использование ГБМ-агара с селективной добавкой для листерий позволяет выделить возбудитель листериоза в более короткие сроки, чем обычные листериозные среды.

Для внедрения питательной среды в схему лабораторной диагностики листериоза необходимы исследования с использованием широкого набора штаммов, относящихся к *L. monocytogenes* и другим видам листерий.

Цель исследования — изучить поведение музейных и клинических штаммов различных видов листерий на ГБМ-агаре для усовершенствования бактериологического метода при выделении и идентификации *L. monocytogenes* в клинической и санитарной микробиологии.

Материалы и методы

В работе использованы: клинический материал (секционный материал, кровь, спинномозговая жидкость, отделяемое цервикального канала), продовольственное сырьё и пищевые продукты, поступившие в испытательный лабораторный центр ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) (всего 1125 образцов); музейные тест-штаммы микроорганизмов, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk»:

L. monocytogenes 766, *L. monocytogenes* NCTC11994, *L. ivanovii* ATCC19119, *L. innocua* NCTC 11288, *L. seeligeri* ATCC 35967, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Staphylococcus aureus* Wood-46, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *N. meningitidis* ATCC 13102, *H. influenzae* ATCC 49247. Пробоподготовка образцов и их исследования осуществлены с использованием алгоритмов и методов, рекомендованных СанПиН 3.3686-21¹, МУК 4.2.1122-02², ГОСТ 32031-2022³. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ГНЦ ПМБ (протокол № ВП-2025/3 от 17.05.2025).

Для накопления листерий использованы питательные среды производства ГНЦ ПМ: питательный бульон для культивирования и выделения листерий с внесением селективной добавки (Среда ПБЛ, ГНЦПМБ, РУ № ФСР 2010/09161); в качестве дифференциально-диагностических — питательный агар для культивирования и выделения листерий с внесением селективной добавки (Среда ПАЛ, ГНЦ ПМБ, РУ № ФСР 2010/09162); *Listeria* Ottaviani Agosti HiCynth Agar (ALOA, «HiMedia», РУ № ФСЗ 2009/03705) с внесением добавок Enrichment Supplement (FD214), Selective Supplement (FD 212A); питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов (ГБМ-агар, ГНЦ ПМБ, РУ № РЗН 2016/4872) с внесением селективной добавки (полимиксина В сульфат — 0,01 г/л; налидиксовая кислота — 0,025 г/л; акрифлавин — 0,01 г/л) (далее — модифицированный ГБМ-агар).

Для определения лецитиназной активности использовали питательную среду для количественного определения микробной загрязнённости (среда № 1 ГРМ, ГНЦ ПМБ, РУ № ФСР 2011/11415) и модифицированный ГБМ-агар с внесением *ex tempore* 5% желточной эмульсии, и эти же среды с внесением активированного угля в концентрации 0,5%.

Идентификацию изолятов проводили на автоматической системе «MALDI Biotyper» («Bruker Daltonik»).

Результаты

Исследования проведены в 2 этапа. Первый этап был посвящён выделению возбудителя листериоза из клинического материала, продовольствен-

ного сырья и пищевых продуктов. Подготовленные к исследованию образцы высевали на среду обогащения — ПБЛ. Через 24 и 48 ч инкубации при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ со среды ПБЛ проводили высеvy культуральной жидкости на специальные питательные среды для выделения листерий (ПАЛ, ALOA). После инкубации отобраны характерные колонии, предположительно относящиеся к листериям, и субкультивированы на среде № 1 ГРМ для последующей идентификации с помощью автоматической системы «MALDI Biotyper». В ходе исследования выделены 89 изолятов *L. monocytogenes*, 2 изолята *L. welshimeri*, 3 изолята *L. innocua*, 1 изолят *L. seeligeri*.

На втором этапе изучили поведение всех выделенных изолятов, в том числе от больных менингитом, и тест-штаммов листерий на ГБМ-агаре в сравнении с поведением их на классических питательных средах (ПАЛ, ALOA) в условиях равнозначности.

На среде ПАЛ выделенные культуры и тест-штаммы *L. monocytogenes* через 24 ч формировали мелкие, сероватого цвета колонии диаметром до 1,0 мм; на 2-е сутки их размер увеличивался до 1,2–1,4 мм. На среде ALOA *L. monocytogenes* вырастали в виде колоний сине-зелёного цвета, окружённых непрозрачным ореолом диаметром 0,6–0,8 мм на 1-е сутки инкубации посевов и диаметром до 2,0 мм — на 2-е сутки. На модифицированном ГБМ-агаре уже через 18 ч инкубации *L. monocytogenes* диаметр колоний достигал 1,5–2,5 мм (рис. 1). Колонии приобретали при этом зеленоватый цвет, в отличие от колоний, полученных на классической среде ПАЛ.

Рост других видов листерий на ГБМ-агаре отличался от роста *L. monocytogenes*. При изучении характера их роста музейные тест-штаммы: *L. ivanovii* ATCC19119, *L. innocua* NCTC 11288, *L. seeligeri* ATCC 35967 и выделенные культуры листерий: *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri* высевали на модифицированный ГБМ-агар и среды сравнения ПАЛ и ALOA. Через 18–24 ч инкубации на модифицированном ГБМ-агаре рост данных видов листерий обнаруживался в виде гладких колоний молочного цвета диаметром 1,6–2,0 мм, в отличие от сред ПАЛ и ALOA, на которых наблюдался рост мелких колоний диаметром 0,3–0,8 мм.

При посеве из смеси тест-штамма *L. monocytogenes* 766 и *L. innocua* NCTC 11288 на модифицированный ГБМ-агар и последующей инкубации при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 18 ч обнаружено, что среда обладает дифференцирующими свойствами: рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766 наблюдался в виде колоний зеленоватого цвета диаметром 1,8–2,2 мм; *L. innocua* NCTC 11288 — в виде колоний молочного цвета диаметром 1,5–1,8 мм (рис. 2).

Кроме того, при добавлении в модифицированную среду ГБМ-агар желточной эмульсии обе-

¹ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (введён в действие 01.09.2021).

² МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах: методические указания». М.; 2002.

³ ГОСТ 32031-2022 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.)».

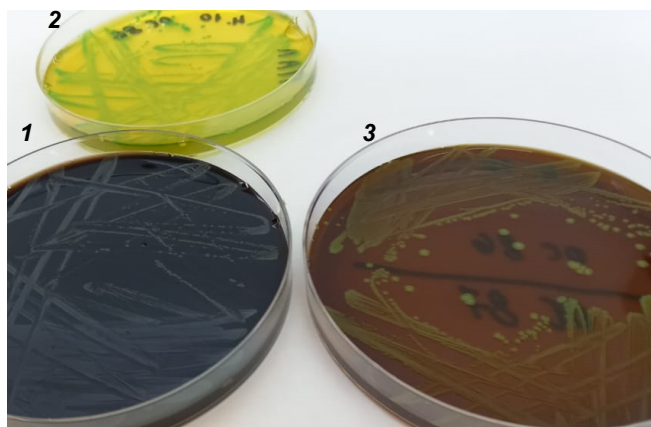


Рис. 1. Рост выделенных культур *L. monocytogenes* на ПАЛ (1), ALOA (2) и модифицированном ГБМ-агаре (3).

спечивалась чёткая дифференциация тест-штамма *L. ivanovii* ATCC19119, обладающего лецитиназной активностью, от тест-штамма *L. innocua* NCTC 11288, не имеющего лецитиназы (**рис. 3**).

Исследования клинического материала, продовольственного сырья и пищевых продуктов на наличие листерий включают стадию по определению лецитиназной активности, наличие которой является показателем патогенности, для подтверждения принадлежности выделенных бактерий к виду *L. monocytogenes*. Оригинальность бактериологического метода основана на сопоставлении лецитиназной активности культуры в присутствии или при отсутствии активированного угля. В данной работе предпринята попытка определить лецитиназную активность листерий в соответствии с методикой, регламентированной нормативными документами МУК 4.2.1122-02 и ГОСТ 32031-2022 при использовании модифицированного ГБМ-агара с внесением желточной эмульсии с активированным углём и без него. Выделенные культуры *L. monocytogenes* и тест-штаммы *L. monocytogenes* 766 и *L. ivanovii* ATCC19119 высевали на среду из разведений 10^{-6} . Посевы инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч и просматривали их в проходящем свете. В качестве контрольной среды сравнения применяли традиционно используемую для этих целей среду № 1 ГРМ.

На среде № 1 ГРМ с внесением желточной эмульсии в присутствии угля через 24 ч наблюдалась плотная зона помутнения вокруг колоний выделенных штаммов *L. monocytogenes*, тест-штамма *L. monocytogenes* 766 и *L. ivanovii* ATCC19119 шириной более 2,0 мм, характерной для проявления лецитиназной активности культур. На той же среде без активированного угля вокруг колоний *L. monocytogenes* зон помутнения не отмечалось, в отличие от колоний *L. ivanovii* ATCC19119.

На модифицированном ГБМ-агаре с желточной эмульсией без угля также наблюдалось чётко разли-

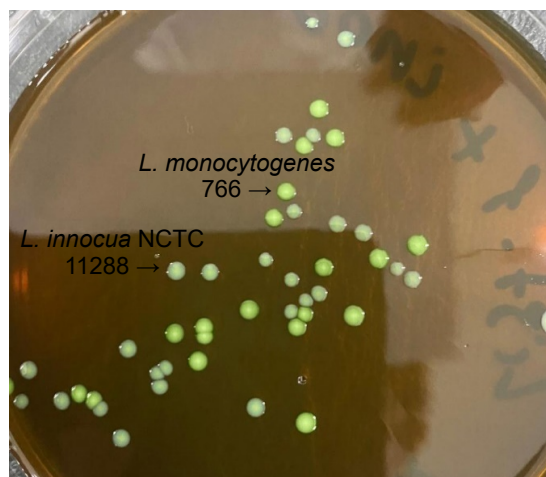


Рис. 2. Рост смеси тест-штаммов *L. monocytogenes* 766 и *L. innocua* NCTC 11288 на модифицированном ГБМ-агаре.

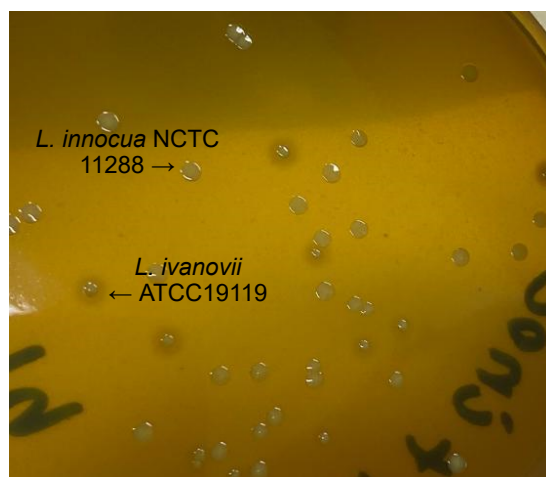


Рис. 3. Рост смеси тест-штаммов *L. ivanovii* ATCC19119 и *L. innocua* NCTC 11288 на модифицированном ГБМ-агаре с внесением желточной эмульсии.

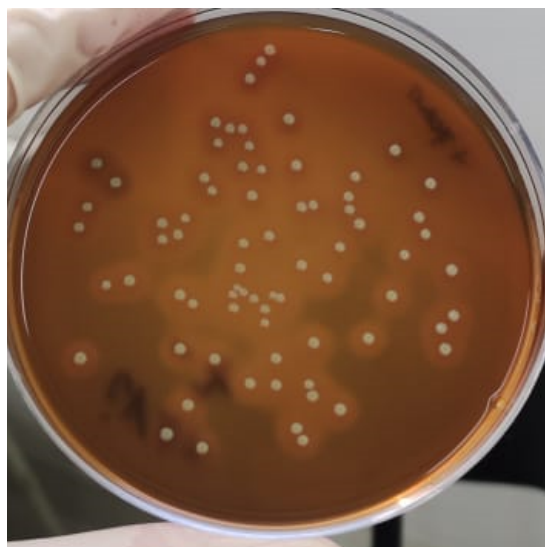


Рис. 4. Рост тест-штамма *L. ivanovii* ATCC19119 на модифицированной среде ГБМ-агар с внесением желточной эмульсии.

чимое проявление лецитиназной активности только вокруг колоний *L. ivanovii* ATCC19119 (рис. 4).

Внесение в модифицированный ГБМ-агар активированного угля в тех же концентрациях приводило к более интенсивному почернению среды, что не дало возможности рассмотреть и правильно интерпретировать результаты по выявлению лецитиназной активности.

При определении селективных свойств модифицированного ГБМ-агара обнаруживалось подавление роста тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* HX 19 222, *S. aureus* Wood-46, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *N. meningitidis* ATCC 13102, *H. influenzae* ATCC 49247 из разведений 10^{-4} .

Обсуждение

Менингит, вызванный *L. monocytogenes*, является серьёзным и опасным для жизни заболеванием. В последние годы *L. monocytogenes* является третьей по распространённости причиной бактериального менингита у пожилых людей после *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* из-за снижения заболеваемости менингитом, вызванным *H. influenzae* типа b в связи с вакцинацией [18]. Заболевание чаще встречается у пожилых людей, клинические проявления при этом виде менингита не специфичны, поэтому для правильной постановки диагноза важно учитывать результаты бактериологического исследования, направленного на выделение и идентификацию возбудителя.

Питательная среда ГБМ-агар, предназначенная для выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов, хорошо зарекомендовала себя при исследовании клинического материала на наличие *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* и *H. influenzae* типа b [15]. Поэтому представляло интерес изучение возможности использования данной питательной среды для выделения листерий, но при использовании для этого специальной селективной добавки для листерий. Входящие в её состав антибиотики ингибируют рост основных возбудителей гнойного бактериального менингита, а также ряда других микроорганизмов (например, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus*). Среду с селективной добавкой назвали модифицированным ГБМ-агаром.

В нашем исследовании изучено поведение различных видов листерий на модифицированном ГБМ-агаре: 89 изолятов *L. monocytogenes*, 2 изолята *L. welshimeri*, 3 изолята *L. innocua*, 1 изолят *L. seeligeri* и 5 тест-штаммов *Listeria* spp. На модифицированном ГБМ-агаре колонии *L. monocytogenes* приобретали зеленоватый цвет и уже через 18 ч инкубации значительно превосходили по размеру колонии на классической среде ПАЛ и даже АЛОА. При этом непатогенные листерии формировали некрупные колонии молочного/кремового цвета. Такая способность модифицированного ГБМ-агара позволит

ускорить выделение и дифференциацию основного возбудителя листериоза — *L. monocytogenes* — от других видов листерий по морфологическим особенностям колоний (цвет и размер).

Добавление в модифицированный ГБМ-агар желточной эмульсии обеспечивало чёткую дифференциацию тест-штамма *L. ivanovii* ATCC19119, обладающего лецитиназной активностью, от тест-штамма *L. innocua* NCTC 11288, не имеющего лецитиназы. Однако добавление активированного угля, который активизирует проявление лецитиназной активности у *L. monocytogenes* на среде № 1 ГРМ, зон помутнения вокруг колоний *L. monocytogenes* не наблюдали. Возможно, такая ситуация объясняется более интенсивным почернением ГБМ-агара, который из-за входящего в его состав стимулятора роста гемофильных микроорганизмов уже окрашен в тёмно-коричневый цвет. И на такой тёмной питательной среде трудно рассмотреть и правильно интерпретировать результаты по выявлению лецитиназной активности.

И.С. Тартаковским и соавт. было отмечено, что идентификация *L. monocytogenes* по выявлению лецитиназной активности часто затруднена вследствие морфологических и биохимических особенностей возбудителя листериоза [13]. В работах отечественных и зарубежных авторов упоминается, что при культивировании на питательных средах, содержащих желточную эмульсию, лецитиназная активность листерий выявляется чрезвычайно слабо или вообще не наблюдается. Добавление активированного угля может сорбировать секретируемый листериями продукт, ингибирующий продуцирование фермента лецитиназы [13, 16, 17].

Заключение

Показана возможность использования в алгоритме культурального метода новой питательной среды (модифицированный ГБМ-агар), обладающей улучшенными ростовыми свойствами в отношении *L. monocytogenes*. Её внедрение послужит дополнительным эффективным средством для дифференциации листерий при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Тюкавкина С.Ю., Котиева И.М., Додохова М.А. и др. Патогенез и клинические формы листериоза человека. Южно-Российский журнал терапевтической практики. 2024;5(1):99–111. Tyukavkina S.Yu., Kotieva I.M., Dodokhova M.A., et al. Pathogenesis and clinical forms of human listeriosis. South-Russian Journal of Therapeutic Practice. 2024;5(1):99–111. DOI: <https://doi.org/10.21886/2712-8156-2024-5-1-99-111> EDN: <https://elibrary.ru/kztkts>
2. Тагирова З.Г., Понезжева Ж.Б., Макашова В.В. и др. Менингоэнцефалит листериозной этиологии. Случай из практики. Лечащий врач. 2023;11(26):21–5. Tagirova Z.G., Ponezhova Zh.B., Makashova V.V., et al. Meningoencephalitis

- of listeriosis etiology. A case from practice. *Lechaschi Vrach Journal*. 2023;11(26):21–5.
DOI: <https://doi.org/10.51793/OS.2023.26.11.003> EDN: <https://elibrary.ru/jfslpg>
3. Нагибина М.В., Бессараб Т.П., Венгеров Ю.Я. и др. Листерийный менингоэнцефалит как оппортунистическое заболевание при ВИЧ-инфекции. *Журнал инфектологии*. 2023; 15(1):68–77. Nagibina M.V., Bessarab T.P., Vengerov Yu.Ya., et al. Listeriosis meningoencephalitis as an opportunistic disease in HIV infection. *Journal Infectology*. 2023;15(1):68–77.
DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2023-15-1-68-77>
EDN: <https://elibrary.ru/ifevbe>
 4. Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Фурсова Н.К. и др. Первый случай выявления *Listeria monocytogenes* сиквенс-типов ST7, ST20, ST425 в сточных водах при обследовании водных объектов Вологодской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):453–64. Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Fursova N.K. et al. The first case of detection of *Listeria monocytogenes* sequence types ST7, ST20, ST425 in wastewater during an investigation of water bodies in the Vologda region. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 2022; 99(4): 453–464.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-266>
EDN: <https://elibrary.ru/gashhr>
 5. Hobbs J.L., Lee C., Thompson B., et al. Two *Listeria monocytogenes* outbreaks in a cancer centre: onsite food premises and their potential health risk to patients. *BMC Public Health*. 2023;23(1):1443.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-023-16371-7>
 6. Сорокина М.Н., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. *Бактериальные менингиты у детей*. М.;2003. Sorokina M.N., Ivanova V.V., Skripchenko N.V. *Bacterial Meningitis in Children*. Moscow;2003.
 7. Тагирова З.Г., Нагибина М.В., Макашова В.В. и др. Листерийный менингоэнцефалит: особенности течения и диагностики (клиническое наблюдение). *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2023;7(11):766–70. Tagirova Z.G., Nagibina M.V., Makashova V.V., et al. *Listeria meningoencephalitis: specifics of its course and diagnosis (case report)*. *Russian Medical Inquiry*. 2023;7(11):766–770.
DOI: <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2023-7-11-9>
EDN: <https://elibrary.ru/xfbfcs>
 8. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., и др. Динамика спектра генотипов *Listeria monocytogenes*, вызвавшей инвазивный листериоз в период циркуляции вариантов SARS-CoV-2 Omicron. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2024;42(3):29–36. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S., et al. Dynamics of the spectrum of genotypes of *Listeria monocytogenes*, which caused invasive listeriosis during the period of circulation of SARS-CoV-2 Omicron variants. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2024;42(3):29–36.
DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen20244203129>
EDN: <https://elibrary.ru/mjgjjvp>
 9. Алексеева Е.А., Шепелин А.П., Полосенко О.В. Опыт выделения *Listeria monocytogenes* на территории Вологодской области. *Бактериология*. 2019;4(2):31–6. Alekseeva E.A., Shepelin A.P., Polosenko O.V. Experience a selection of *Listeria monocytogenes* in the territory of the Vologda region. *Bacteriology*. 2019;4(2):31–6.
DOI: <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2019-2-31-36>
EDN: <https://elibrary.ru/humtek>
 10. Меньшиков В.В., ред. *Клиническая лабораторная аналитика. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Том 6*. М.;2003:578–82. Men'shikov V.V., ed. *Clinical Laboratory Analysis. Private Analytical Technologies in the Clinical Laboratory. Volume 6*. Moscow;2003:578–82.
 11. Xu X., Shan Y., Cen Y., et al. Clinical characteristics and treatment of *Listeria monocytogenes* infections in the central nervous system. *Infect. Drug Resist.* 2023;16:5899–909.
DOI: <https://doi.org/10.2147/idr.s424012>
 12. Paranjape N. Rhombencephalitis due to *Listeria monocytogenes*. *IDCases*. 2021;24:e01081. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01081>
 13. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. *Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика*. М.;2002. Tartakovsky I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. *Listeria: its role in human infectious pathology and laboratory diagnostics*. Moscow;2002.
EDN: <https://elibrary.ru/pbdion>
 14. Алексеева Е.А., Миронов А.Ю., Полосенко О.В. и др. Выделение и идентификация листерий из клинического материала. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022;67(6):362–8. Alekseeva E.A., Mironov A.Yu., Polosenko O.V., et al. Isolation and identification of *Listeria* in clinical material. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2022;67(6):362–8.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-362-368>
EDN: <https://elibrary.ru/hiaphn>
 15. Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Круглов А.Н. и др. Сравнительная оценка питательных сред для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов. *Инфекция и иммунитет*. 2016;6(4):389–94. Podkopaev Ya.V., Domotenko L.V., Kruglov A.N., et al. Comparative evaluation of culture media for pathogen isolation of purulent bacterial meningitis. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2016;6(4):389–94.
EDN: <https://elibrary.ru/xetljd>
 16. Омарова С.М., Исаева Р.И., Багандова Д.Ш. и др. Разработка и изучение питательных сред для определения биологических свойств листерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022;67(2):110–4. Omarova S.M., Isaeva R.I., Bagandova D.Sh., et al. Development and study of nutrient media for determining the biological properties of *Listeria*. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2022;67(2):110–4.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-110-114>
EDN: <https://elibrary.ru/vuylev>
 17. Vazquez-Boland J.A., Kocks C., Dramsi S., et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 1992;60(1):219–30.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.60.1.219-230.1992>
 18. Amaya-Villar R., Garcia-Cabrera E., Sulleiro-Igual E., et al. Three-year multicenter surveillance of community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *BMC Infect. Dis.* 2010;10:324. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-324>
 19. Guillet C., Join-Lambert O., Le Monnier A., et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16(1):136–8.
DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1601.091155>
 20. Perrin M., Bemer M., Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(11):5308–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.41.11.5308-5309.2003>
 21. Rocourt J., Hof H., Schrettenbrunner A., et al. Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1986;116(8):248–51. (in French)

Информация об авторах

Храмов Михаил Владимирович — канд. мед. наук, зам. директора по качеству и развитию ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, khramov@obolensk.org, <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>

Домотенко Любовь Викторовна — канд. хим. наук, в. н. с. лаб. разработки питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, domotenko@obolensk.org, <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>

Полосенко Ольга Вадимовна — канд. биол. наук, в. н. с. сектора микробиологических исследований ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, polosenko.olga@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5961-9041>

Мицевич Ирина Петровна — с. н. с. лаб. антимикробных препаратов ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, mitsevichev@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2324-502X>

Участие авторов: Храмов М.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование; Домотенко Л.В. — проведение экспериментов, концепция и дизайн исследования, статистическая обработка материала, анализ и обобщение полученных данных, написание текста статьи; Полосенко О.В. — проведение экспериментов, концепция и дизайн исследования, анализ и обобщение полученных данных, статистическая обработка материала, работа с источниками литературы, написание текста статьи; Мицевич И.П. — проведение экспериментов, сбор материала, анализ и обобщение полученных данных. 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 21.03.2025;
принята к публикации 26.05.2025;
опубликована 28.06.2025

Information about the authors

Mikhail V. Khramov — Cand. Sci. (Med.), Deputy director for quality and development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, khramov@obolensk.org, <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>

Lyubov V. Domotenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Nutrient medium development laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, domotenko@obolensk.org, <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>

Olga V. Polosenko — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Microbiology research sector, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, polosenko.olga@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5961-9041>

Irina P. Mitsevich — senior researcher, Antimicrobial drugs laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, mitsevichev@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2324-502X>

Authors' contribution: Khramov M.V. — research concept and design, editing; Domotenko L.V. — conducting experiments, research concept and design, statistical processing of the material, analysis and generalization of the data obtained, writing the text of the article; Polosenko O.V. — conducting experiments, research concept and design, analysis and generalization of the data obtained, statistical processing materials, work with literature sources, writing the text of the article; Mitsevich I.P. — conducting experiments, collecting material, analyzing and summarizing the data obtained. 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 21.03.2025;
accepted for publication 26.05.2025;
published 28.06.2025

ОБЗОРЫ



Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-628>

Органоидные (3D-клеточные) культуры в оценке способности вирусов к межвидовым переходам

Кузнецова Т.А.^{1✉}, Галкина И.В.², Крыжановский С.П.³, Щелканов М.Ю.^{1,2}¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия;²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия;³Дальневосточное отделение Российской академии наук, Владивосток, Россия

Аннотация

Цель обзора — охарактеризовать возможности применения органоидных (3D-клеточных) культур для оценки способности вирусов к межвидовым переходам.

Использованы источники из баз данных Web of Science, PubMed, Scopus, Elsevier, Google Scholar и eLIBRARY.RU по состоянию на февраль 2025 г.

В работе системы эпидемиологического надзора, помимо классических методов эпидемиологической диагностики и надзора за вирусными инфекциями, широко применяются молекулярно-генетические технологии (полимеразная цепная реакция и секвенирование). Как показывает передовой мировой опыт, в решении этих вопросов перспективным является использование органоидных (3D-клеточных) культур. В настоящем обзоре проанализированы данные по применению органоидных (3D-клеточных) культур человеческого и животного происхождения для изучения иммунопатогенеза, а также оценки способности ряда вирусов (SARS-CoV-2, гриппа, Зика, кори и др.) к межвидовым переходам, что обуславливает их пандемический потенциал.

Ключевые слова: обзор, органоидные (3D-клеточные) культуры, вирусы, межвидовые переходы, эпидемиология

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования. Работа выполнена в рамках Государственного задания НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора № 141-00089-21-00 на 2021–2025 гг.

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

Для цитирования: Кузнецова Т.А., Галкина И.В., Крыжановский С.П., Щелканов М.Ю. Органоидные (3D-клеточные) культуры в системе эпидемиологического надзора за вирусными инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):370–380.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-628>EDN: <https://www.elibrary.ru/SMVGQJ>

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-628>

Organoid (3D-cell) cultures in the assessment of cross-species virus transmission

Tatyana A. Kuznetsova^{1✉}, Irina V. Galkina², Sergey P. Kryzhanovskiy³, Mikhail Yu. Shchelkanov^{1,2}¹G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia;²Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia;³Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract

The **aim** of this review is to characterize the possibilities of using organoid (3D-cell) cultures to assess the ability of viruses for cross-species transmission.

Sources from Web of Science, PubMed, Scopus, Elsevier, Google Scholar, and eLIBRARY.RU databases as of February 2025 were used.

In addition to classical methods of epidemiologic diagnostics and surveillance of viral infections, molecular genetic technologies (polymerase chain reaction and sequencing) are widely used in the epidemiologic surveillance system. As the best world experience shows, the use of organoid (3D-cell) cultures is promising in addressing these issues. This review analyzes data on the use of organoid (3D-cell) cultures of human and animal origin to study immunopathogenesis, as well as to assess the ability of a number of viruses (SARS-CoV-2, influenza, Zika, measles, etc.) for cross-species transmission, which determines their pandemic potential

Keywords: *review, organoid (3D-cell) cultures, viruses, cross-species transmission, epidemiology*

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding. The work was carried out within the framework of the State assignment of G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, No. 141-00089-21-00 for 2021-2025.

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

For citation: Kuznetsova T.A., Galkina I.V., Krizhanovsky S.P., Shchelkanov M.Yu. Organoid (3D-cell) cultures in the assessment of cross-species virus transmission. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(3):370–380.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-628>

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

Введение

Успешное решение задач по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения требует совершенствования деятельности российской сети специализированных учреждений в области эпидемиологического надзора — системы комплексного наблюдения за эпидемическим процессом конкретного заболевания в динамике на определённой территории с целью повышения эффективности профилактических и противоэпидемических мероприятий [1].

Пандемия COVID-19, этиологически связанная с коронавирусом тяжёлого острого респираторного синдрома 2-го типа (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome 2), с одной стороны, продемонстрировала предсказательные возможности эпидемиологических методов (о пандемическом потенциале коронавирусов отечественные специалисты предупреждали за несколько лет до начала пандемии [2–4]), а с другой стороны — способствовала формированию новых подходов: геномного эпидемиологического надзора [5]. Геномный эпидемиологический мониторинг в настоящее время является одним из основных элементов крупного федерального проекта «Санитарный щит — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)», который Роспотребнадзор осуществляет на территории Российской Федерации [6]. Этот проект включает построение сети диагностических ПЦР-лабораторий и центров секвенирования, оснащённых современными высокоэффективными NGS-секвенаторами [5, 7]. Полученные данные агрегируются Российской платформой генетических данных VGARus [5]. Однако,

наряду с молекулярно-генетическими методами исследований, классические методы эпидемиологического надзора в области вирусологии, в частности подходы, связанные с клеточными культурами, также продолжают активно развиваться [8, 9]. В то же время, с учётом современных потребностей и возможностей, получили применение 3D-клеточные культуры.

Способность вирусов к межвидовым переходам обуславливает пандемический потенциал вирусов [10–12]. Большинство пандемий связано с вирусами, в числе которых могут быть ещё не идентифицированные и потенциально опасные вирусы, способные быстро эволюционировать и передаваться от одного организма-хозяина к другому. Причинами появления новых потенциально опасных вирусов могут быть изменение климата и таяние полярных ледников, урбанизация, торговля дикими животными. В связи с возможностью возникновения новых эпидемических вспышек вирусных заболеваний, вызванных новыми или мутирующими вирусами, создающими значительные угрозы здоровью населения, необходимо планирование адекватных профилактических и противоэпидемических мероприятий. В их числе — разработка новых экспериментальных моделей для изучения вирусов. Прогнозирование способности вирусов к межвидовым переходам также нуждается в новых экспериментальных моделях.

Цель обзора — охарактеризовать современные возможности применения органоидных (3D-клеточных) культур для оценки способности вирусов к межвидовым переходам.

Проанализирована научная литература, представленная в основных базах данных (Web of

Science, PubMed, Scopus, Elsevier, Google Scholar и eLIBRARY.RU) по состоянию на февраль 2025 г.

Применение органоидных (3D-клеточных) культур в вирусологии

Метод органоидных (3D-клеточных) культур нашёл широкое применение в вирусологии для культивирования и изучения репродукции вирусов человека и животных, изучения механизмов иммуннопатогенеза, разработки и тестирования противовирусных препаратов и вакцин [13–15]. Сравнительно новым аспектом использования органных культур является решение с их помощью ряда вопросов, касающихся эпидемиологического надзора и мониторинга вирусных инфекций. В частности, органоидные (3D-клеточные) культуры применяются для оценки способности вирусов к межвидовым переходам, что обуславливает их пандемический потенциал.

Органоиды и их разновидность — сфероиды — относятся к 3D-культурам. Единого определения органоидов не существует, но неотъемлемой их характеристикой является многоклеточность, способность к самоорганизации и выполнению каких-либо физиологических функций органа. Сфероиды — 3D-клеточные культуры, которые в процессе пролиферации образуют сфероподобные образования, что позволяет клеткам расти и дифференцироваться в нескольких направлениях.

Органоиды получают из плюрипотентных стволовых клеток, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и эмбриональные стволовые клетки, а также из дифференцированных клеток или клеток опухолевой ткани [16–18]. Протоколы получения органоидов по способу получения подразделяют на две большие группы:

- различные модификации метода Ланкастера (2014) [19], различающиеся по срокам культивирования и применению индукторов дифференцировки с последующим вызреванием в микропробирках или планшетах [20];
- использование биореакторов или минибиореакторов [21].

Одним из подходов к созданию 3D-клеточных моделей является клеточная линия, выращенная на трёхмерном гелевом каркасе, а также культура сфероидов либо органотипическая (органная) культура, полученная непосредственно фрагментированием органа и его последующим культивированием [18]. 3D-культуры занимают более выгодное положение по сравнению с 2D-культурами и моделями *in vivo*, поскольку позволяют воспроизводить структуру реальных органов, управлять сигнальными путями и редактировать геномы клеток в среде, напоминающей организм, но лишены ряда недостатков живых систем. Отличная от нативной морфология клеток в 2D-клеточной культуре негативно влияет на кле-

точные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, экспрессию генов и белков. Кроме того, эти культуры имеют опухолевое происхождение, генетически нестабильны и не воспроизводят сложные межклеточные взаимодействия, необходимые для моделирования вирусных инфекций [8, 9, 22].

Преимуществом 3D-клеточных систем и, в частности, органоидов, по сравнению с клеточными линиями, является воспроизводимость клеточных слоев и структуры тканей, присутствующих в органах. Органоиды можно культивировать в течение более длительных периодов, замораживать и использовать для изучения физиологических явлений более реалистично, чем это возможно с клеточными линиями. Несмотря на то что культуры органоидов дороги и с трудом воспроизводят масштаб массивных систем культивирования клеточных линий, технологии по их конструированию быстро развиваются [13–15, 23].

Структура органоидов способствует усилению тропности вирусов к тканям и увеличивает вероятность развития вирусной инфекции [14, 23]. Человеческие органоиды стали важным инструментом в области исследований вирусных инфекций, сыграли большую роль в их моделировании и исследовании молекулярных механизмов, лежащих в основе их патогенеза. Только органоидные системы позволяют изучить реальное взаимодействие вируса с хозяином, патогенез инфекции, вопросы лечения и профилактики. Органоиды также представляют собой незаменимую модель для межвидовой проверки новых вирусов [14, 23, 24], о чём идёт речь ниже. Однако с точки зрения вирусологии применение органоидов в России пока находится в зачаточном состоянии.

Как отмечают ряд авторов, существует острая необходимость в использовании более совершенных биологических систем для исследования вирусных инфекций, в том числе для оценки межвидового потенциала антропоозоонозных вирусов [12, 25].

Применение органоидных культур человеческого происхождения для изучения преодоления вирусами межвидового барьера

Взаимодействие между вирусом и хозяином является основной движущей силой эволюции вируса. Экологию вируса можно понять только через экологию его актуальных и потенциальных хозяев [26]. Природно-очаговые возбудители инфекционных заболеваний являются сочленами естественных биоценозов и могут циркулировать без участия человека [27]. Если человек оказывается на территории природного очага, то он может стать случайным хозяином возбудителя, причём в некоторых случаях возможно формирование антропонозной цепи его передачи [28].

Ключевым элементом экологической пластичности природно-очаговых вирусов является их способность преодолевать межвидовые барьеры. В наибольшей степени эта способность выражена у арбовирусов, которые передаются позвоночным путём биологической трансмиссии членистоногими переносчиками [26, 28]. К экологической группе арбовирусов относится, в частности, вирус Зика (Amarillovirales: Flaviviridae, *Flavivirus*), который является причиной спорадической заболеваемости в Африке и Азии, а в 2015 г. проник в Южную Америку [29]. Для изучения иммунопатогенеза лихорадки Зика и путей заражения этим вирусом использованы органоиды головного мозга, поскольку он ассоциирован с повышенным риском развития неврологических осложнений у взрослых и детей, а также вызывает пороки развития мозга у плодов инфицированных беременных женщин [30]. Органоидные культуры активно используются для изучения путей заражения и механизмов межвидовых переходов и для других арбовирусов: Чикунгунья (Martellivirales: Togaviridae, *Alphavirus*), японского энцефалита (Amarillovirales: Flaviviridae, *Flavivirus*), Повассан (Amarillovirales: Flaviviridae, *Flavivirus*); Денге (Amarillovirales: Flaviviridae, *Flavivirus*) [14, 31].

Примером применения органоидов в качестве подходящей модели для межвидовых вирусологических исследований является открытие и характеристика клеточных рецепторов CD46 для вируса кори (Mononegavirales: Paramyxoviridae, *Morbillivirus*). На модели органоидов дыхательной системы человека установлено, что вакцинные и лабораторно адаптированные штаммы этого вируса используют в качестве рецептора CD46 (молекула адгезии, экспрессируемая ядерными клетками человека и действующая как костимулирующий фактор для Т-лимфоцитов), тогда как вакцинные и клинические штаммы дикого типа не способны к использованию CD46 [32]. Затем был идентифицирован ещё один рецептор для адгезии диких штаммов вируса кори — нектин-4 (nectin-4) или PVRL4 (poliovirus receptor-related 4), интенсивно экспрессируемый на базолатеральной стороне эпителиальных клеток [33]. Это открытие привело к созданию новой парадигмы о том, как вирус кори проникает в дыхательные пути и покидает хозяина, что отразилось на разработке профилактических мероприятий.

Что касается вирусов, передающихся контактным путём, порог проникновения в человеческую популяцию понижен для вирусов человекообразных обезьян (Primates: Hominidae). Вирус иммунодефицита человека 1-го и 2-го типов некогда произошёл от вируса иммунодефицита обезьян (Ortervirales: Retroviridae, *Lentivirus*) [28], и тканевый тропизм этих вирусов активно изучают на органоидных культурах [34]. Вирус оспы обезьян (Chitovirales:

Poxviridae, *Orthopoxvirus*), вызывающий большую настороженность у эпидемиологов, способен легко передаваться от приматов к человеку и вызывать эпидемические вспышки [28]. Y. Watanabe и соавт. (2023) использовали модели органоидов толстой кишки и кератиноцитов человека, полученных из плюрипотентных клеток, для изучения динамики репликации этого вируса в соответствующих тканях; было показано, что вирус наиболее интенсивно накапливается в кератиноцитах, дисфункция которых была связана со значительным повреждением митохондрий [35]. Чем более уникален — не только в генетическом, но и в физиологическом плане — основной хозяин вируса, тем сложнее вирусу преодолеть межвидовой барьер. Особенно интересны в этом отношении рукокрылые (*Chiroptera*), физиология и паразитом (включая вирусом) которых весьма специфичны [36]. Летучие мыши считаются естественным резервуаром различных вирусов, включая SARS-CoV-2, вирус Эбола и возможно другие. В большинстве случаев для эффективного проникновения в человеческую популяцию вирусам рукокрылых необходим промежуточный хозяин. Наиболее известное исключение из этого правила составляют лиссавирусы (Mononegavirales: Rhabdoviridae, *Lyssavirus*), вызывающие бешенство, которые легко преодолевают межвидовые барьеры вследствие универсальности никотинового ацетилхолинового рецептора нервных окончаний, используемых для проникновения этих вирусов в клетку-мишень [28]. Именно поэтому органоиды нервной системы являются удобными и широко используемыми 3D-моделями для изучения путей заражения и механизмов межвидовых переходов лиссавирусов [37]. Для эболавирусов (Mononegavirales: Filoviridae, *Ebolavirus*) и марбургвирусов (Mononegavirales: Filoviridae, *Marburgvirus*), ассоциированных с геморрагическими лихорадками, в качестве факультативных (в некоторых случаях возможна и прямая передача возбудителя человеку от рукокрылых) промежуточных хозяев выступают приматы, которые долгое время считались природным резервуаром филовирсов [38]. В этом случае были эффективны органоиды кровеносных сосудов, позволяющие установить особенности патогенеза инфекции [39].

Для SARS-CoV (severe acute respiratory coronavirus — коронавируса тяжёлого острого респираторного синдрома)¹, который вызвал крупную эпидемию в Китае в 2002–2003 гг. [3], промежуточным хозяином стали гималайские циветы (*Paguma larvata*) [40]; для MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome — коронавируса Ближневосточного респираторного синдрома), вызвавшего серию эпидемических вспышек на Аравийском

¹ В связи с появлением SARS-CoV-2 в настоящее время допускается именовать SARS-CoV как SARS-CoV-1.

полуострове и множество завозных случаев по всему миру [3], — одnogорбые верблюды-дромадеры (*Camelus dromedarius*) [40]; для пандемического SARS-CoV-2 — панголины (*Pholidota*), которые широко встречаются на рынках Юго-Восточной Азии, поскольку их дериваты используются в восточной медицине, а мясо считается деликатесом [40, 41]. Значительный эпидемический потенциал коронавирусов рукокрылых [40] требует необходимости разработки органоидных моделей для изучения межвидовых переходов этих вирусов.

Принимая во внимание, что вирусы гриппа, Эбола, Зика, пандемический вариант коронавируса (SARS-CoV-2) продемонстрировали значительные угрозы общественному здравоохранению, органоидные культуры нашли применение для более глубокого понимания механизмов патогенеза и путей заражения при этих инфекциях.

Одновременно с широким внедрением геномного эпиднадзора пандемия COVID-19 стимулировала имплементацию клеточных 3D-моделей для изучения возбудителя этого заболевания, в частности — органоидных культур лёгких, бронхов и миндалин, печени и кишечника, почек и кровеносных сосудов человека [42]. Было показано, что COVID-19 является сосудистым заболеванием и вызывает прямое повреждение эндотелия [43]. На органоидах головного мозга был исследован нейронинвазивный потенциал SARS-CoV-2 [44]. Использование кишечных энтероидов человека, в которых поддерживалась устойчивая репликация SARS-CoV-2, наряду с обнаружением вирусной РНК в образцах кала и с развитием желудочно-кишечных симптомов у некоторых пациентов с COVID-19, подтвердило, что желудочно-кишечный тракт может служить одним из путей передачи SARS-CoV-2 в дополнение к воздушно-капельному [45]. Применение органоидной модели верхних дыхательных путей и лёгких человека для культивирования SARS-CoV-2 показало, что эта релевантная и надёжная модель для исследования коронавирусов имеет дополнительную ценность для тестирования других респираторных вирусов, изучения иммунопатогенеза, разработки терапевтических и профилактических мероприятий [42].

Одним из наиболее изученных примеров преодоления вирусом межвидовых барьеров является вирус гриппа А (Articulavirales: Orthomyxoviridae, *Alphainfluenzavirus*), природным резервуаром которого являются птицы водно-околоводного экологического комплекса — в первую очередь гусеобразные (*Anseriformes*) и ржанкообразные (*Charadriiformes*) [26–28]. Все варианты этого вируса, циркулирующие среди млекопитающих, включая эпидемические [46] и пандемические [47] варианты, имеют предшественников в популяциях диких птиц.

Для изучения путей заражения при инфекции, вызванной вирусами гриппа А субтипов H1N1, H3N2, H7N1 и H5N1, были использованы органоиды головного мозга [14, 48]. Для изучения способности к размножению вирусов гриппа и других респираторных инфекций также использовались органоиды дыхательных путей человека с реснитчатым эпителием [48, 49]. Например, органоиды бронхов — для культивирования вирусов гриппа типов А (*Alphainfluenzavirus*), В (*Betainfluenzavirus*) и С (*Gammainfluenzavirus*) [50], органоиды лёгких — для вирусов парагриппа (Mononegavirales: Paramyxoviridae) 1-го, 3-го (*Respirovirus*), 2-го, 4-го (*Rubulavirus*) типов [48]. На органоидах дыхательных путей человека, содержащих основные типы эпителиальных клеток респираторного тракта, при моделировании гриппа А выявлена различная степень инфекционности штаммов человека и птиц. Это относится к размножению вируса, тропизму к тканям и продукции цитокинов на эти штаммы [51].

С использованием органоидных моделей респираторного тракта проводилось исследование рецептор-связывающего сайта гемагглютинаина штаммов, адаптированных к птицам. Установлено, что этот сайт имеет высокую аффинность к $\alpha 2'$ -3'-сиалозидам, в то время как эпидемические штаммы имеют сродство к $\alpha 2'$ -6'-сиалозидам; свиньи (*Suidae*) содержат клетки с обоими указанными типами сиалозидов, поэтому в их организме может происходить естественная адаптация птичьих вариантов вируса к «человеческой» рецепторной специфичности [26, 28, 52]. Ситуация осложняется тем, что клетки столбчатого эпителия в верхних отделах респираторного тракта человека несут на своей поверхности, главным образом, $\alpha 2'$ -6'-сиалозиды, а в нижних отделах — $\alpha 2'$ -3'-сиалозиды. Поэтому в процессе инфекции каждого отдельного человеческого организма возможна постепенная положительная селекция вирусных вариантов с $\alpha 2'$ -3'-специфичностью рецептор-связывающего сайта гемагглютинаина по мере перехода инфекции от верхних дыхательных путей к бронхиолам, что способствует развитию тяжёлых (вплоть до летальных) первичных вирусных пневмоний [53]. В связи с этим разработка органоидных (3D-моделей) для изучения дрейфа рецепторной специфичности вируса гриппа А в зависимости от условий его взаимодействия с клетками имеет значение не только в контексте адаптации вируса к человеческому организму и для изучения вопросов преодоления вирусами межвидового барьера, но и для прогнозирования клинических последствий развития инфекции.

Органоидные культуры животных в изучении преодоления вирусами межвидового барьера

По разным оценкам, из 1,5 тыс. известных в мире инфекционных заболеваний 60% имеют жи-

вотное происхождение, причём около 75% новых инфекционных заболеваний имеют зоонозный характер, а 25% зоонозов возникают у домашних животных. Вирусы являются этиологическими агентами зоонозов примерно в 30% случаев. Зоонозные вирусные инфекции у животных являются прямым доказательством способности вирусов преодолевать межвидовые барьеры и заражать человека [41, 54, 55].

Применение органоидов животных для моделирования зоонозных инфекций открывает перспективы для исследования взаимодействия хозяин–патоген при зоонозных вирусных инфекциях [41, 56, 57]. В этом аспекте для научно обоснованного прогнозирования возникновения новых опасных для человека вирусных вариантов с эпидемическим потенциалом, помимо молекулярно-генетических методов, значительный интерес представляют межвидовые (cross-species) органоидные культуры на основе клеток человека и животных [58]. По мнению ряда исследователей, применение таких органоидов способствует обеспечению биосистемы для подтверждения зоонозного потенциала вновь появляющихся вирусов, эффективному изучению цикла заражения этими вирусами у различных видов домашних и диких животных и способности вирусов к межвидовым переходам, в том числе адаптироваться к организму человека. Кроме того, использование межвидовых органоидов позволяет культивировать новые вирусы, не поддающиеся выращиванию в клеточных линиях [57, 58].

Y. Sang и соавт. проанализировали статус и потенциал межвидовых органоидных культур и отметили необходимость их разработки для изучения межвидовой восприимчивости и исследования вновь появляющихся зоонозных вирусов как у домашних, так и у диких животных. Авторы также отмечают необходимость адаптировать технологию получения органоидов человека для разработки органоидов животных, и в 1-ю очередь, на основе органов дыхания [58].

Несмотря на интенсивные исследования в связи с распространением возбудителя COVID-19 и других зоонозных респираторных вирусов, до текущего года не было сообщений о респираторных или лёгочных органоидах животных, поскольку респираторный тракт является одним из основных путей для вирусной инфекции. Только в 2025 г. появилось сообщение о разработке органоидов лёгких летучих мышей вида *Rousettus leschenaultia*. Эти органоиды успешно воспроизводят структуру и морфологию лёгочного эпителия, а также экспрессируют рецепторы входа коронавируса, подобные человеческим — ACE2-рецепторы (angiotensin-converting enzyme 2 — ангиотензинпревращающий фермент 2-го типа) и TMPRSS2 (transmembrane protease serine group 2 — трансмембранная сериновая про-

теаза 2-го типа). Такая модель очень востребована и представляет широкие перспективы для изучения инфекций, исходящих от летучих мышей [59].

По мнению ряда исследователей, интегрирование органоидных культур в эпидемиологическое прогнозирование способствует решению вопросов, касающихся межвидовых переходов вирусов, особенно после существенной оптимизации человеческих органоидных систем [24, 60, 61]. В качестве примера оптимизированной системы D. Holthaus и соавт. подразумевают гармонизированную систему межвидовых культур органоидов для моделирования инфекционных заболеваний животных [62]. С этой целью при использовании трансвелл-платформы разработаны кишечные органоиды, полученные из стволовых клеток четырех видов (человек, мышь, свинья и курица), которые являются важными хозяевами токсоплазмы *Apicomplexa* и других простейших как агентов зоонозных инфекций [62]. В этом аспекте также интересна работа, посвящённая межвидовому анализу транскриптома клеток эпителия подвздошной кишки мыши, крысы, свиньи, макаки и человека, в которой предоставлена информация о клеточном составе этих органов и их функциональном назначении у 4 видов млекопитающих и человека. Полученные результаты также показали, что крыса и человек имеют схожие паттерны экспрессии генов, что важно для изучения метаболизма лекарственных препаратов. По всей вероятности, эти данные важны и для конструирования межвидовых (cross-species) органоидов [63].

Недостаточное количество животных моделей обусловлено индивидуальным разнообразием животного мира и другими проблемами (особенно по отлову и обследованию диких животных). В этом аспекте органоидные системы представляют прекрасную замену для изучения межвидовой и видоспецифической инфекционности вирусов. Для поддержания и дифференциации органоидов различных видов домашних и диких животных требуется видоспецифическая оптимизация условий культивирования. Так, для генерации кишечных органоидов мыши необходимы кондиционированные среды, содержащие соответствующие факторы роста и дифференцировки стволовых клеток, которых пока не существует для большинства видов животных [64–66]. Проблему сложности экспериментального подтверждения восприимчивости к коронавирусу у большинства видов животных, особенно у диких, выделяют и другие исследователи. Они также считают, что существенная оптимизация органоидов человека поможет в решении вопросов эпидемиологического прогнозирования [24, 44, 60].

После получения определённой органоидной культуры животных требуется дать ей аутентичную характеристику, например, на предмет гетерогенности клеток и дифференциации линий (экспрессии

генов) и др. С этой целью требуются различные клеточные маркеры. Такие маркеры существуют в отношении человека и мыши, но очень ограничены в отношении большинства видов животных [61, 67].

Несмотря на это, за последние 10 лет активизировались исследования, связанные с органоидами животных [59, 66, 68–70].

Животноводческие фермы, где содержатся несколько различных видов животных, особенно в случаях, когда в окружении могут быть дикие животные, являются возможным местом для появления новых штаммов вирусов и их передачи человеку. Органоидам сельскохозяйственных животных отведена важная роль в исследовании зоонозных и репродуктивных заболеваний не только для улучшения сельскохозяйственного производства, но и в целях благополучия в сфере общественного здравоохранения. Кишечные органоиды, полученные из крипт или плюрипотентных стволовых клеток, могут служить моделями для исследования механизмов межклеточных или патоген–хозяин взаимодействий при зоонозных инфекциях желудочно-кишечного тракта, при которых животные могут выступать в качестве бессимптомных носителей [69, 70].

Для успешного моделирования различных вирусных инфекций у животных и исследования взаимодействия патоген–хозяин в кишечнике использованы кишечные органоиды основных видов сельскохозяйственных животных: домашней свиньи (*Sus scrofa*) [71, 72], крупного рогатого скота (*Bos taurus*) [68, 73], овец (*Ovis aries*) [74] и других животных.

Получены органоиды толстого и тонкого кишечника мартышек (модельные нечеловеческие приматы, восприимчивые к желудочно-кишечным заболеваниям), способные к пассированию и длительному культивированию [75].

Также получены органоидные модели, воспроизводящие различные органы домашних плотоядных: кошек (*Felis catus*), собак (*Canis lupus*) [76, 77], поскольку нельзя исключать, что домашние животные могут являться промежуточными хозяевами при передаче вирусных инфекций [28, 68]. Установлено, что различные виды животных, включая домашних (кошек, собак, хомяков) и диких (львов, тигров), заражаются SARS-CoV-2 [78–80]. Большое число работ посвящено применению органоидов животных для изучения патогенеза коронавирусной инфекции. Так, при инфицировании энтероидов, полученных из разных сегментов кишечника свиней, двумя видами коронавируса (вирус эпидемической диареи свиней (*Porcine epidemic diarrhea virus*) и вирус трансмиссивного гастроэнтерита (*Transmissible gastroenteritis suum*)) был выявлен тропизм коронавируса к определённым клеткам [71, 72]. Получены кишечные органоиды (энтероиды) китайских подковоносов

(*Rhinolophus sinicus*), воспроизводящие кишечный эпителий и восприимчивые к инфекции SARS-CoV-2, в отличие от неудачных попыток с применением клеточных культур [45]. На основании результатов моделирования молекулярной структуры рецептора ACE2 *in silico* основным кандидатом на роль промежуточного хозяина стал малайский панголин (*Manis javanica*) [81]. Как отмечено выше, зарегистрированы органоиды лёгких летучих мышей, клетки которых экспрессировали рецепторы входа ACE2 и TMPRSS2 для коронавируса [59].

Несмотря на то что многочисленные исследования с органоидами сельскохозяйственных животных направлены на моделирование инфекций, большинство авторов сходятся во мнении, что эта клеточная технология открывает большие перспективы применения в ветеринарии, сельском хозяйстве, биомедицинских науках, а также для оценки и прогнозирования возможности преодоления вирусами межвидового барьера.

Заключение

В практике работы системы эпидемиологического надзора за вирусными инфекциями, помимо современных молекулярно-генетических технологий (ПЦР и секвенирование), являющихся основными инструментами эпидемиологических исследований, весьма актуально и перспективно использование органоидных (3D-клеточных) культур.

В обзоре проанализированы многочисленные примеры применения органоидных (3D-клеточных) культур человеческого и животного происхождения при моделировании и изучении патогенеза инфекций, вызываемых вирусами гриппа, Зика, кори и др. Отдельное внимание уделено анализу исследований с применением таких культур при расшифровке пандемии новой коронавирусной инфекции, которые позволили раскрыть источник и причины её быстрого распространения по миру. Значительный интерес в изучении преодоления вирусами межвидового барьера и способности адаптироваться к организму человека представляет разработка межвидовых органоидных культур на основе клеток человека и диких и домашних животных. Такие сведения необходимы для построения стратегии предотвращения и контроля межвидовой передачи и разработки научно обоснованных мероприятий по недопущению возникновения эпидемических вспышек. Несмотря на интенсивные исследования, существует ряд ограничений и проблем, касающихся межвидовых органоидных культур. Это ряд конструктивных особенностей, вопросы повышения их воспроизводимости, видоспецифической оптимизации и стандартизации протоколов культивирования. Открытым остаётся вопрос о возможности конструирования органоидов путём слияния клеток человека и животных.

Таким образом, органоидные (3D-культуры) человеческого и животного происхождения представляют эффективную модель для изучения патогенеза вирусных инфекций, взаимодействия вируса и хозяина и для решения вопросов, связанных с межвидовой передачей вирусов, следовательно, и для реализации целей и задач эпидемиологического надзора за вирусными инфекциями.

Будучи широко имплементированы в деятельность вирусологических и микробиологических лабораторий, эти модели будут способствовать разработке научно обоснованного прогноза проникновения патогенов от диких и сельскохозяйственных животных в человеческую популяцию, профилактических мероприятий, эффективных химиопрепаратов и стратегий лечения пациентов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ|REFERENCES

1. Попова А.Ю., Зайцева Н.В., Май И.В. Опыт методической поддержки и практической реализации риск-ориентированной модели санитарно-эпидемиологического надзора: 2014–2017 гг. *Гигиена и санитария*. 2018;97(1):5–9. Popova A.Yu., Zaytseva N.V., May I.V. Experience of methodological support and practical implementation of the risk-oriented model of sanitary-epidemiological surveillance in 2014–2017. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018;97(1):5–9. DOI: <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-1-5-9> EDN: <https://elibrary.ru/ywrndr>
2. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;(2):94–8. Shchelkanov M.Yu., Ananiev V.Yu., Kuznetsov V.V., Shumatov V.B. Middle East respiratory syndrome: when will smouldering focus outbreak? *Pacific Medical Journal*. 2015;(2):94–8. EDN: <https://elibrary.ru/ulfnff>
3. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Львов Д.К. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. *Лечащий врач*. 2013;(10):49–54. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Lvov D.K. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic threat. *Lechaschi Vrach*. 2013;(10):49–54. EDN: <https://elibrary.ru/takhvr>
4. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Эпидемическая вспышка Ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май-июль 2015 г.): причины, динамика, выводы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;(3):89–93. Shchelkanov M.Yu., Ananiev V.Yu., Kuznetsov V.V., Shumatov V.B. Epidemic outbreak of MERS in the Republic of Korea (May–July, 2015): reasons, dynamics, conclusions. *Pacific Medical Journal*. 2015;(3):89–93. EDN: <https://elibrary.ru/ulhaer>
5. Попова А.Ю., Щелканов М.Ю., Крылова Н.В. и др. Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):19–35. Popova A.Yu., Shchelkanov M.Yu., Krylova N.V., et al. Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai during the COVID-19 pandemic. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(1):19–35. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497> EDN: <https://elibrary.ru/pujffa>
6. Рудаков Н.В., Пенневская Н.А. Федеральный проект «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)». *Национальные приоритеты России*. 2024;(2):47–59. Rudakov N.V., Pennevskaya N.A. Federal project "The country's sanitary shield – health safety (prevention, detection, response)" is the most important stage in the implementation of the national security strategy of the Russian Federation. *National Priorities of Russia*. 2024;(2):47–59. EDN: <https://elibrary.ru/beaecf>
7. Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Хафизов К.Ф. и др. Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):163–72. Akimkin V.G., Semenenko T.A., Khafizov K.F. Genomic surveillance strategy. Problems and perspectives. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(2):163–72. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-507> EDN: <https://elibrary.ru/mymnik>
8. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Алиев М.Р., Щелканов М.Ю. Клеточные культуры в вирусологии: от прошлого к будущему. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):143–53. Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Aliev M.R., Shchelkanov M.Yu. The cell cultures in virology: from the past to the future. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(1):143–53. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-421> EDN: <https://elibrary.ru/xsaecy>
9. Dolskiy A.A., Grishchenko I.V., Yudkin D.V. Cell cultures for virology: usability, advantages, and prospects. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21(21):7978. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21217978>
10. Jonas O., Seifman R. Do we need a global virome project? *Lancet Glob. Health*. 2019;7(10):e1314–6. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30335-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30335-3)
11. Carlson C.J., Albery G.F., Merow C., et al. Climate change increases cross-species viral transmission risk. *Nature*. 2022;607(7919):555–62. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04788-w>
12. Choudhury P.R., Saha T., Goel S., et al. Cross-species virus transmission and its pandemic potential. *Bull. Natl Res. Cent*. 2022;46(1):18. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00701-7>
13. Кузнецова Т.А., Алиев М.Р., Михалко А.А., Щелканов М.Ю. 3D клеточные культуры: перспективы использования в вирусологии. *Инфекция и иммунитет*. 2025;14(6):1045–62. Kuznetsova T.A., Aliev M.R., Mikhalko A.A., Shchelkanov M.Yu. 3D cell cultures: prospects for use in virology. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2025; 14(6):1045–62. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-DCC-17656> EDN: <https://elibrary.ru/ucpvib>
14. Pajkrt D., Krenn V., Rocha-Pereira J. Editorial: Human organoid technology for virus research. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2023;13:1155252. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1155252>
15. Yan J., Monlong J., Cougoule C., et al. Mapping the scientific output of organoids for animal and human modeling infectious diseases: a bibliometric assessment. *Vet. Res*. 2024;55(1):81. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01333-7>
16. Chen K.G., Mallon B.S., Park K., et al. Pluripotent stem cell platforms for drug discovery. *Trends Mol. Med*. 2018;24(9):805–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.06.009>
17. Liu S., Xie B., Song X., et al. Self-formation of RPE spheroids facilitates enrichment and expansion of hiPSC-derived RPE generated on retinal organoid induction platform. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2018;59(13): 5659–69. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.1723613>
18. Suarez-Martinez E., Suazo-Sanchez I., Celis-Romero M., Carnero A. 3D and organoid culture in research: physiology, hereditary genetic diseases and cancer. *Cell Biosci*. 2022;12(1):39. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00775-w>

19. Lancaster M.A., Knoblich J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 2014;9(10):2329–40. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>
20. Yakoub A.M., Sadek M. Development and characterization of human cerebral organoids: an optimized protocol. *Cell Transplant.* 2018;27(3):393–406. DOI: <https://doi.org/10.1177/0963689717752946>
21. Qian X., Jacob F., Song M.M., et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat. Protoc.* 2018;13(3):565–80. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.152>
22. Hematian A., Sadeghifard N., Mohebi R., et al. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health Res. Perspect.* 2016;7(2):77–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>
23. De Oliveira L.F., Filho D.M., Marques B.L., et al. Organoids as a novel tool in modelling infectious diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2023;144:87–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.09.003>
24. Sridhar A., Simmini S., Ribeiro C.M.S., et al. A perspective on organoids for virology research. *Viruses.* 2020;12(11):1341. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12111341>
25. Barrila J., Crabbé A., Yang J., et al. Modeling host-pathogen interactions in the context of the microenvironment: three-dimensional cell culture comes of age. *Infect. Immun.* 2018;86(11):e00282–18. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00282-18>
26. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology.* Academic Press;2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01020-9>
27. Щелканов М.Ю., Леонова Г.Н., Галкина И.В., Андрюков Б.Г. У истоков концепции природной очаговости. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО.* 2021;(5):16–25. Shchelkanov M.Yu., Leonova G.N., Galkina I.V., Andryukov B.G. At the origins of the natural focal point concept. *Public Health and Life Environment – PH&LE.* 2021;(5):16–25. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-338-5-16-25> EDN: <https://elibrary.ru/kfstlj>
28. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных.* М.;2013. Lvov D.K., ed. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals. Handbook of Virology.* Moscow;2013. DOI: <https://elibrary.ru/tlzmhf>
29. Musso D., Ko A.I., Baud D. Zika virus infection — after the pandemic. *N. Engl. J. Med.* 2019;381(15):1444–57. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1808246>
30. Cugola F.R., Fernandes I.R., Russo F.B., et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534(7606):267–71. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature18296>
31. Schultz E.M., Jones T.J., Xu S., et al. Cerebral organoids derived from a Parkinson's patient exhibit unique pathogenesis from Chikungunya virus infection when compared to a non-Parkinson's patient. *Pathogens.* 2021;10(7):913. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10070913>
32. Tatsuo H., Ono N., Tanaka K., Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000;406(6798):893–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/35022579>
33. Noyce R.S., Richardson C.D. Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. *Trends Microbiol.* 2012;20(9):429–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.05.006>
34. Donadoni M., Cakir S., Bellizzi A., et al. Modeling HIV-1 infection and NeuroHIV in hiPSCs-derived cerebral organoid cultures. *J. Neurovirol.* 2024;30(4):362–79. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13365-024-01204-z>
35. Watanabe Y., Kimura I., Hashimoto R., et al. Virological characterization of the 2022 outbreak-causing monkeypox virus using human keratinocytes and colon organoids. *J. Med. Virol.* 2023;95(6):e28827. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.28827>
36. Щелканов М.Ю., Табакаева Т.В., Любченко Е.Н. и др. *Рукокрылые: общая характеристика отряда.* Владивосток;2021. Shchelkanov M.Yu., Tabakaeva T.V., Lyubchenko E.N., et al. *Chiropterans: General Characteristics of the Order.* Vladivostok;2021. DOI: <https://doi.org/10.24866/7444-5119-6>
37. Antonucci J., Gehrke L. Cerebral organoid models for neurotropic viruses. *ACS Infect. Dis.* 2019;5(12):1976–9. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.9b00339>
38. Щелканов М.Ю., Магассуба Н.Ф., Дедков В.Г. и др. Природный резервуар филловирсов и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2017;72(2):112–9. Shchelkanov M.Yu., Magassouba N.F., Dedkov V.G., et al. Natural reservoir of filoviruses and types of associated epidemic outbreaks in Africa. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2017;72(2):112–9. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn803> EDN: <https://elibrary.ru/yntsev>
39. Werschler N., Penninger J. Generation of human blood vessel organoids from pluripotent stem cells. *J. Vis. Exp.* 2023;(191). DOI: <https://doi.org/10.3797/164715>
40. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г. и др. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет.* 2020;10(2):221–46. Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., et al. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2020;10(2):221–46. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412> EDN: <https://elibrary.ru/kziwqr>
41. Huang X.Y., Chen Q., Sun M.X., et al. A pangolin-origin SARS-CoV-2-related coronavirus: infectivity, pathogenicity, and cross-protection by preexisting immunity. *Cell Discov.* 2023;9(1):59. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00557-9>
42. Han Y., Yang L., Lacko L.A., Chen S. Human organoid models to study SARS-CoV-2 infection. *Nat. Methods.* 2022;19(4):418–28. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01453-y>
43. Siddiqi H.K., Libby P., Ridker P.M. COVID-19 — a vascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2021;31(1):1–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2020.10.005>
44. Ramani A., Muller L., Ostermann P.N., et al. SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *EMBO J.* 2020;39(20):e106230. DOI: <https://doi.org/10.15252/emboj.2020106230>
45. Zhou J., Li C., Liu X., et al. Infection of bat and human intestinal organoids by SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020;26(7):1077–83. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0912-6>
46. Щелканов М.Ю., Кириллов И.М., Шестопалов А.М. и др. Эволюция вируса гриппа А/Н5N1 (1996–2016). *Вопросы вирусологии.* 2016;61(6):245–56. Shchelkanov M.Yu., Kirillov I.M., Shestopalov A.M., et al. Evolution of influenza A/H5N1 virus (1996–2016). *Problems of Virology.* 2016;61(6):245–56. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-245-256> EDN: <https://elibrary.ru/xehnfh>
47. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(H1N1)v в России. *Вопросы вирусологии.* 2010;55(3):4–9. Lvov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., et al. Spread of new pandemic influenza A(H1N1)v virus in Russia. *Problems of Virology.* 2010;55(3):4–9. EDN: <https://elibrary.ru/muekip>
48. Chen Y.W., Huang S.X., de Carvalho A.L.R.T., et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2017;19(5):542–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb3510>
49. Tang H., Abouleila Y., Si L., et al. Human organs-on-chips for virology. *Trends Microbiol.* 2020;28(11):934–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.06.005>

50. Hui K.P.Y., Ching R.H.H., Chan S.K.H., et al. Tropism, replication competence, and innate immune responses of influenza virus: an analysis of human airway organoids and *ex vivo* bronchus cultures. *Lancet Respir. Med.* 2018;6(11):846–54. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30236-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30236-4)
51. Long J.S., Mistry B., Haslam S.M., Barclay W.S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019;17(2):67–81. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0115-z>
52. Bhowmick R., Derakhshan T., Liang Y., et al. A three-dimensional human tissue-engineered lung model to study influenza A infection. *Tissue Eng. Part A.* 2018;24(19-20):1468–80. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0449>
53. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных в 2009–2011 гг., структурой рецептор-связывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. *Вопросы вирусологии.* 2012;57(1):14–20. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., et al. Correlation between the receptor specificity of pandemic influenza A (H1N1) pdm09 virus strains isolated in 2009–2011 and the structure of the receptor-binding site and the probability of fatal primary viral pneumonia. *Problems of Virology.* 2012;57(1):14–20. EDN: <https://elibrary.ru/oximwz>
54. Shaheen M.N.F. The concept of one health applied to the problem of zoonotic diseases. *Rev. Med. Virol.* 2022;32(4):e2326. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.2326>
55. Tomori O., Oluwayelu D.O. Domestic animals as potential reservoirs of zoonotic viral diseases. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2023;11:33–55. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-062922-060125>
56. Bourdon G., Cadoret V., Charpigny G., et al. Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction and their applications to reproductive biotechnologies. *Vet. Res.* 2021;52(1):42. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00891-w>
57. Jaewon C., Eun-Hye H., Hyun-Jeong K. Disease modeling in organoid cultures: a new tool for studying viruses. *Organoid.* 2022;2:e15. DOI: <https://doi.org/10.51335/organoid.2022.2.e15>
58. Sang Y., Miller L.C., Nelli R.K., Giménez-Lirola L.G. Harness organoid models for virological studies in animals: a cross-species perspective. *Front. Microbiol.* 2021;12:725074. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725074>
59. Elbadawy M., Saito N., Kato Y., et al. Establishment of a bat lung organoid culture model for studying bat-derived infectious diseases. *Sci. Rep.* 2025;15(1):4035. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88621-0>
60. Schutgens F., Clevers H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 2020;15:211–34. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611>
61. Wilson S.S., Mayo M., Melim T., et al. Optimized culture conditions for improved growth and functional differentiation of mouse and human colon organoids. *Front. Immunol.* 2021;11:547102. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.547102>
62. Holthaus D., Delgado-Betancourt E., Aebischer T., et al. Harmonization of protocols for multi-species organoid platforms to study the intestinal biology of toxoplasma gondii and other protozoan infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;10:610368. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.610368>
63. Li H., Wang X., Wang Y., et al. Cross-species single-cell transcriptomic analysis reveals divergence of cell composition and functions in mammalian ileum epithelium. *Cell Regen.* 2022;11(1):19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13619-022-00118-7>
64. Corró C., Novellademunt L., Li V.S.W. A brief history of organoids. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2020;319(1):C151–65. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
65. Hofer M., Lutolf M.P. Engineering organoids. *Nat. Rev. Mater.* 2021;6(5):402–20. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y>
66. Gabriel V., Zdyrski C., Sahoo D.K., et al. Adult animal stem cell-derived organoids in biomedical research and the one health paradigm. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(2):701. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25020701>
67. Dawson H.D., Sang Y., Lunney J. K. Porcine cytokines, chemokines and growth factors: 2019 update. *Res. Vet. Sci.* 2020;131:266–300. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.022>
68. Kar S.K., Wells J.M., Ellen E.D., et al. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Vet. Res.* 2021;52(1):43. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00904-2>
69. Seeger B. Farm animal-derived models of the intestinal epithelium: recent advances and future applications of intestinal organoids. *Altern. Lab. Anim.* 2020;48(5-6):215–33. DOI: <https://doi.org/10.1177/0261192920974026>
70. Pain B. Organoids in domestic animals: with which stem cells? *Vet. Res.* 2021;52(1):38. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00911-3>
71. Luo H., Zheng J., Chen Y., et al. Utility evaluation of porcine enteroids as PDCoV infection model *in vitro*. *Front. Microbiol.* 2020;11:821. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00821>
72. Li Y., Yang N., Chen J., et al. Next-generation porcine intestinal organoids: an apical-out organoid model for swine enteric virus infection and immune response investigations. *J. Virol.* 2020;94(21):e01006–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01006-20>
73. Topfer E., Pasotti A., Telopoulou A., et al. Bovine colon organoids: from 3D bioprinting to cryopreserved multi-well screening platforms. *Toxicol. In Vitro.* 2019;61:104606. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104606>
74. Liu M., Yu W., Jin J., et al. Copper promotes sheep pancreatic duct organoid growth by activation of an antioxidant protein 1-dependent MEK-ERK pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2020;318(4):C806–16. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00509.2019>
75. Ishimura A., Iwatsuki K., Imai H. Establishment of intestinal organoids from common marmosets. *Organoids.* 2025;4(1):3. DOI: <https://doi.org/10.3390/organoids4010003>
76. Penning L., van den Boom R. Companion animal organoid technology to advance veterinary regenerative medicine. *Front. Vet. Sci.* 2023;10:1032835. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1032835>
77. Sahoo D. Canine intestinal organoids as a novel in vitro model of intestinal drug permeability: a proof-of-concept study. *Cells.* 2023;12(9):1269. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12091269>
78. Haaker M.W., Kruitwagen H.S., Vaandrager A.B., et al. Identification of potential drugs for treatment of hepatic lipidosis in cats using an in vitro feline liver organoid system. *J. Vet. Intern. Med.* 2020;34(1):132–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.15670>
79. Conceicao C., Thakur N., Human S., et al. The SARS-CoV-2 Spike protein has a broad tropism for mammalian ACE2 proteins. *PLoS Biol.* 2020;18(12):e3001016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001016>
80. Sang E.R., Tian Y., Gong Y., et al. Integrate structural analysis, isoform diversity, and interferon-inductive propensity of ACE2 to predict SARS-CoV2 susceptibility in vertebrates. *Heliyon.* 2020;6(9):e04818. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04818>
81. Zhang B.Z., Chu H., Han S., et al. SARS-CoV-2 infects human neural progenitor cells and brain organoids. *Cell Res.* 2020;30(10):928–31. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0390-x>

Информация об авторах

Кузнецова Татьяна Алексеевна[✉] — д-р мед. наук, г. н. с. лаб. иммунобиологических препаратов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, takuznets@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>

Галкина Ирина Вячеславовна — канд. мед. наук, в. н. с. Международного научно-образовательного центра биобезопасности при кафедре эпидемиологии, микробиологии и паразитологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, galkina333@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7000-5833>

Крыжановский Сергей Петрович — д-р мед. наук, зам. председателя Президиума Дальневосточного отделения Российской академии наук по научной работе, Владивосток, Россия, kryzhanovskiy@hq.febras.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1981-1079>

Щелканов Михаил Юрьевич — д-р биол. наук, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; зав. каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Участие авторов: Кузнецова Т.А., Щелканов М.Ю. — разработка концепции и дизайна исследования; Кузнецова Т.А., Галкина И.В., Крыжановский С.П. — сбор и обработка материала; Кузнецова Т.А. — написание текста; Щелканов М.Ю. — редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 11.03.2025;
принята к публикации 20.05.2025;
опубликована 28.06.2025

Information about the authors

Tatyana A. Kuznetsova[✉] — Dr. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of immunobiological preparates, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, takuznets@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>

Irina V. Galkina — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, International scientific and educational center for biosafety, Department of epidemiology, microbiology and parasitology, School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, galkina333@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7000-5833>

Sergey P. Kryzhanovsky — Dr. Sci. (Med.), Deputy Chairman for scientific work, Presidium of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, kryzhanovskiy@hq.febras.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1981-1079>

Mikhail Yu. Shchelkanov — Dr. Sci. (Biol.), Director, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Head, Department of epidemiology, microbiology and parasitology, School of medicine and life sciences, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Authors' contribution. Kuznetsova T.A., Shchelkanov M.Yu. — concept and design of the study development; Kuznetsova T.A., Galkina I.V., Kryzhanovsky S.P. — collection and processing of material; Kuznetsova T.A. — text writing; Shchelkanov M.Yu. — text editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 11.03.2025;
accepted for publication 20.05.2025;
published 28.06.2025

ЮБИЛЕИ



К 60-летию академика РАН Василия Геннадьевича Акимкина

3 июля 2025 года отмечает 60-летие Василий Геннадьевич Акимкин, доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии наук, директор Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора.

Более 30 лет своей жизни Василий Геннадьевич посвятил проблемам эпидемиологии и организации эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, в том числе на основе молекулярно-генетических методов и цифровых технологий, профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, иммунопрофилактики, устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам. За годы научной и научно-организационной деятельности В.Г. Акимкин создал научную эпидемиологическую школу и внёс неоценимый вклад в развитие отечественной эпидемиологической науки.

Василий Геннадьевич Акимкин окончил Томский медицинский институт (1988) и Военно-медицинскую академию (1994). В 2007–2010 гг. занимал пост Главного государственного санитарного врача Министерства обороны Российской Федерации. За годы службы им были разработаны и внедрены в практику деятельности Вооружённых Сил РФ научные принципы защиты военнослужащих и мирного населения от современных эпидемиологических угроз. В результате проведённых концептуальных реформ и санитарно-эпидемиологических мероприятий в армии достигнуто существенное снижение уровня заболеваемости военнослужащих вирусным гепатитом А, брюшным тифом, гриппом, внебольничными пневмониями и ветряной оспой.

Научная деятельность академика В.Г. Акимкина охватывает широкий круг задач современной медицины и здравоохранения. Им научно обоснованы, разработаны и внедрены в практику эпидемиологически безопасная система обращения с медицинскими отходами в России, современные методы и инновационные отечественные технологии очистки и дезинфекции воздуха в медицинских организациях. На основании фундаментальных научных исследований В.Г. Акимкиным разработано современное научное направление комплексного использования бактериофагов для лечения и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, позволяющее в короткие сроки локализовать и ликвидировать длительно существующие эпидемические очаги. Изучена иммунологическая и эпидемиологи-



ческая эффективность вакцинации против гепатита В медицинского персонала и отдельных категорий пациентов с применением отечественных вакцин.

В 2018 г. Василий Геннадьевич Акимкин принял руководство Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии Роспотребнадзора, и сегодня его имя неразрывно связано с новейшей историей института. За это время ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора стал крупнейшим развивающимся научно-производственным комплексом, решающим задачи в области эпидемиологического надзора, диагностики, профилактики и лечения широкого спектра инфекционной и неинфекционной патологии человека. Благодаря организаторской деятельности В.Г. Акимкина был введён в эксплуатацию Научный центр по профилактике и борьбе со СПИДом; ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора стал девятым в мире международным референс-центром Продовольственной и сельскохозяйственной организации Организации Объединённых Наций по устойчивости к противомикробным препаратам.

В 2020 г., в период начала пандемии новой коронавирусной инфекции, под руководством В.Г. Акимкина в короткие сроки были организованы действия сотрудников ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по созданию, регистрации и массовому промышленному выпуску уникальных тест-систем (наборов реагентов) для диагностики COVID-19. Было выполнено 8 распоряжений

Правительства Российской Федерации по обеспечению отечественными тест-системами медицинских учреждений России и 40 стран. Проведено рекордное количество исследований (более 5 млн) методом ПЦР-диагностики населения г. Москвы и Московской области, выполнено более 1 млн серологических тестов на наличие антител против новой коронавирусной инфекции у населения, проведено секвенирование более 300 тыс. штаммов SARS-CoV-2.

Под руководством В.Г. Акимкина развёрнута беспрецедентная деятельность по созданию базы данных геномов возбудителей инфекционных болезней (Российская платформа агрегации геномов возбудителей инфекционных болезней — VGARus), включающей на сегодня более 400 тыс. образцов геномов более 80 различных патогенов. Сегодня в Институте продолжается работа по расширению спектра изучения геномов возбудителей других инфекционных болезней, разрабатываются и внедряются в практику инновационные решения на основе технологии CRISPR-Cas и метода петлевой изотермической амплификации нуклеиновых кислот, позволяющие проводить диагностику инфекционных болезней в 3–4 раза быстрее, чем стандартным методом ПЦР.

Академиком РАН В.Г. Акимкиным впервые в Российской Федерации разработаны научные и методологические основы функционирования геномного эпидемиологического надзора, основанного на мониторинге генетических свойств возбудителей инфекционных болезней — ведущего («движущего») фактора развития эпидемического процесса.

В.Г. Акимкин возглавляет Президиум Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов; удостоен золотой медали им. В.И. Покровского — высшей награды Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов и Евро-Азиатского общества специалистов по инфекционным болезням.

В.Г. Акимкин — автор более 1500 опубликованных научных работ (в том числе 20 монографий, 14 руководств для врачей), 79 патентов РФ на изобретения, 46 баз данных, 111 программных продуктов для ЭВМ, в том числе 8 международных публикаций по системе РСТ, более 40 методических рекомендаций и пособий для врачей. Индекс Хирша — 33, Web of Science — 14, SCOPUS — 19.

Под его руководством защищено более 40 кандидатских и докторских диссертаций.

Василий Геннадьевич Акимкин ведет активную общественную и научную деятельность: он является председателем Президиума Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов; членом Бюро Секции профилактической медицины Отделения медицинских наук РАН; председателем Комиссии Научного совета по микробиологии, эпидемиологии и инфекцион-

ным болезням Отделения медицинских наук РАН; членом двух диссертационных советов по специальности «Эпидемиология» на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; учёным секретарем Экспертного совета ВАК РФ по медико-профилактическим наукам; членом Бюро Комиссии по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Роспотребнадзора; входит в редакционные советы и редакционные коллегии более 20 научных журналов.

В.Г. Акимкин — заслуженный врач Российской Федерации (2010); имеет государственные награды: орден Почета (2006), орден Пирогова (2022). Является лауреатом правительственных и национальных премий: «Лучший врач года» в номинации «Санитарный врач» (2005), национальной премии лучшим врачам России «Призвание» в номинации «За вклад в развитие медицины, внесённый представителями фундаментальной науки и немедицинских профессий» (2011), премии Правительства в области науки и техники (2017), национальной премии лучшим врачам России «Призвание» в номинации «За вклад в развитие медицины, медицинской науки и здравоохранения, внесённый представителями науки — научными работниками и (или) врачами любых специальностей и (или) специалистами с высшим немедицинским образованием» (2023).

В.Г. Акимкин награждён медалями, почётными грамотами и имеет благодарности от президента Российской академии наук; министра обороны Российской Федерации; руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; министра здравоохранения Российской Федерации; Apparata Совета Федерации Федерального Собрания Российской Федерации; Apparata Государственной Думы Федерального Собрания Российской Федерации, прокуратуры, Центральной избирательной комиссии и др.

Научная деятельность академика РАН, доктора медицинских наук, профессора Василия Геннадьевича Акимкина вносит значительный вклад в развитие отечественной науки.

Коллектив Центрального научно-исследовательского института Роспотребнадзора, многотысячный коллектив членов Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов», авторы и читатели научно-практических журналов «Вопросы вирусологии» и «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии», учредителем и издателем которых является ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, поздравляют Василия Геннадьевича Акимкина с 60-летним юбилеем!

Примите искренние пожелания процветания Вашему великому делу! От всей души желаем Вам здоровья, творческих сил и вдохновения для новых побед и великих свершений!

К 100-летию профессора Нatalьи Николаевны Костюковой



6 июля 2025 года отмечает свой 100-летний юбилей заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор Наталья Николаевна Костюкова, старейший сотрудник Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи.

Наталья Николаевна — высококвалифицированный специалист в области медицинской микробиологии и эпидемиологии, чей трудовой стаж составляет 76 лет.

Закончив с отличием 1-й Московский медицинский институт, Наталья Николаевна избрала путь учёного и посвятила свою жизнь служению медицинской науке. В 1947 г. поступила в аспирантуру Московского Научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова по специальности «микробиология», где выполнила и защитила кандидатскую диссертацию «Микрофлора гематогенных остеомиелитов». Далее вся её трудовая деятельность связана с НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, в котором она трудится вот уже более 60 лет и вносит несомненный вклад в развитие отечественной медицинской науки.

Являясь с 1976 по 1992 г. руководителем лаборатории этиологии и эпидемиологии острых менингитов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР (позже — РАМН), Наталья Николаевна внесла существенный вклад в расшифровку этиологической структуры острых гнойных менингитов у детей, в том числе новорождённых, в результате чего были значительно расширены представления о возбудителях этих заболеваний в нашей стране.

В зоне строительства Байкало-Амурской железнодорожной магистрали (БАМ) ею были проведены широкомасштабные исследования по выявлению менингококковой инфекции, практическим результатом которых явилась осуществлённая под её руководством впервые в СССР вакцинация детей, предотвратившая развитие надвигавшейся эпидемии менингококковой инфекции в зоне строительства БАМ и в Республике Тува.

Наталья Николаевна является автором таких научных работ, как «Уроки дифтерии» (1999), «Эпидемический процесс гонококковой инфекции — анализ и современные тенденции» (2012), обзоров о современных менингококковых (2024) и пневмококковых (2023) вакцинах, дифтерийном бактерионосительстве (2018).

Н.Н. Костюкова — ведущий научный сотрудник НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Ей принадлежат свыше 250 научных трудов, в том числе монографии по частной медицинской микробиологии и



этиологической диагностике инфекций (2010) и оппортунистическим инфекциям: возбудителям и этиологической диагностике (2013). Под её руководством защищены докторская и 19 кандидатских диссертаций.

Наталья Николаевна много сил и внимания уделяет воспитанию научных кадров, в том числе консультируя аспирантов и докторантов. Её лекции, доклады всегда подготовлены на высоком научном уровне, чётко структурированы, содержат яркие, убедительные примеры, факты, обоснования, документы и научные доказательства, что способствует формированию у молодых учёных современного научного мышления.

В течение нескольких последних десятилетий она остается бессменным учёным секретарем Научного совета по комплексной проблеме «Микробиология».

Широкий кругозор и высокая эрудиция в сочетании с огромной творческой активностью и трудолюбием позволяют Наталье Николаевне Костюковой быть признанным научным лидером не только в нашей стране, но и за рубежом.

Распоряжением Президента Российской Федерации от 26.06.2025 № 251-рп «О поощрении» за заслуги в области здравоохранения и многолетнюю добросовестную работу заслуженному деятелю науки Российской Федерации, ведущему научному сотруднику, доктору медицинских наук, профессору Н.Н. Костюковой объявлена благодарность Президента Российской Федерации.

Коллектив НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, члены Общероссийской общественной организации «Все-российское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов», редакция «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» поздравляют Наталью Николаевну с юбилеем и желают ей мира и здоровья.

НЕКРОЛОГ

Памяти Виталия Александровича Романова



29 июня 2025 года на 84-м году жизни скончался Виталий Александрович Романов, заведующий кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией, профессор, доктор медицинских наук, Почётный работник высшего профессионального образования России, Почётный профессор Ярославского государственного медицинского университета.

Вся трудовая научно-педагогическая деятельность Виталия Александровича Романова связана с Ярославским государственным медицинским университетом. После окончания аспирантуры на кафедре микробиологии Воронежского медицинского института в 1967 году он прошёл путь от ассистента до заведующего кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией Ярославского государственного медицинского университета (с 1975 года).

Высококвалифицированный врач, учёный, педагог Виталий Александрович Романов оказывал большую помощь практическому здравоохранению в подготовке врачей-бактериологов, их сертификации и аттестации. Совместно с органами здравоохранения Ярославской области и Роспотребнадзором Виталий Александрович неоднократно принимал участие в организации и проведении противоэпидемических мероприятий в периоды проведения в

нашей стране Олимпийских игр, Игр доброй воли, других массовых мероприятий, участвовал в исследовании причин вспышек различных инфекций и купировании их распространения.

Профессор В.А. Романов проявил себя выдающимся научным работником и педагогом, готовил дипломированных специалистов высшей квалификации в области микробиологии и иммунологии. Им подготовлены 26 кандидата наук и 2 доктора наук. В.А. Романов является автором 385 научных работ.

Награждён дипломом мэрии г. Ярославля за многолетний добросовестный труд, активное участие в общественной жизни и большой вклад в социально-экономическое развитие города, почётным знаком губернатора Ярославской области «За заслуги в науке», золотой медалью Вернадского Российской Академии Естествознания «За заслуги в науке», присвоены звания Почетный работник высшего профессионального образования РФ, Отличник здравоохранения РФ.

Коллектив Ярославского государственного медицинского университета и редакция журнала выражают глубокие соболезнования родным и близким Виталия Александровича.